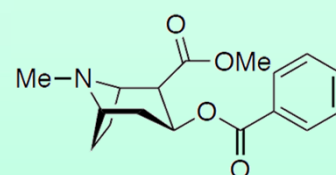
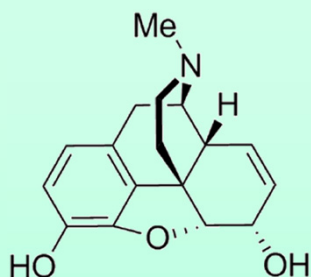
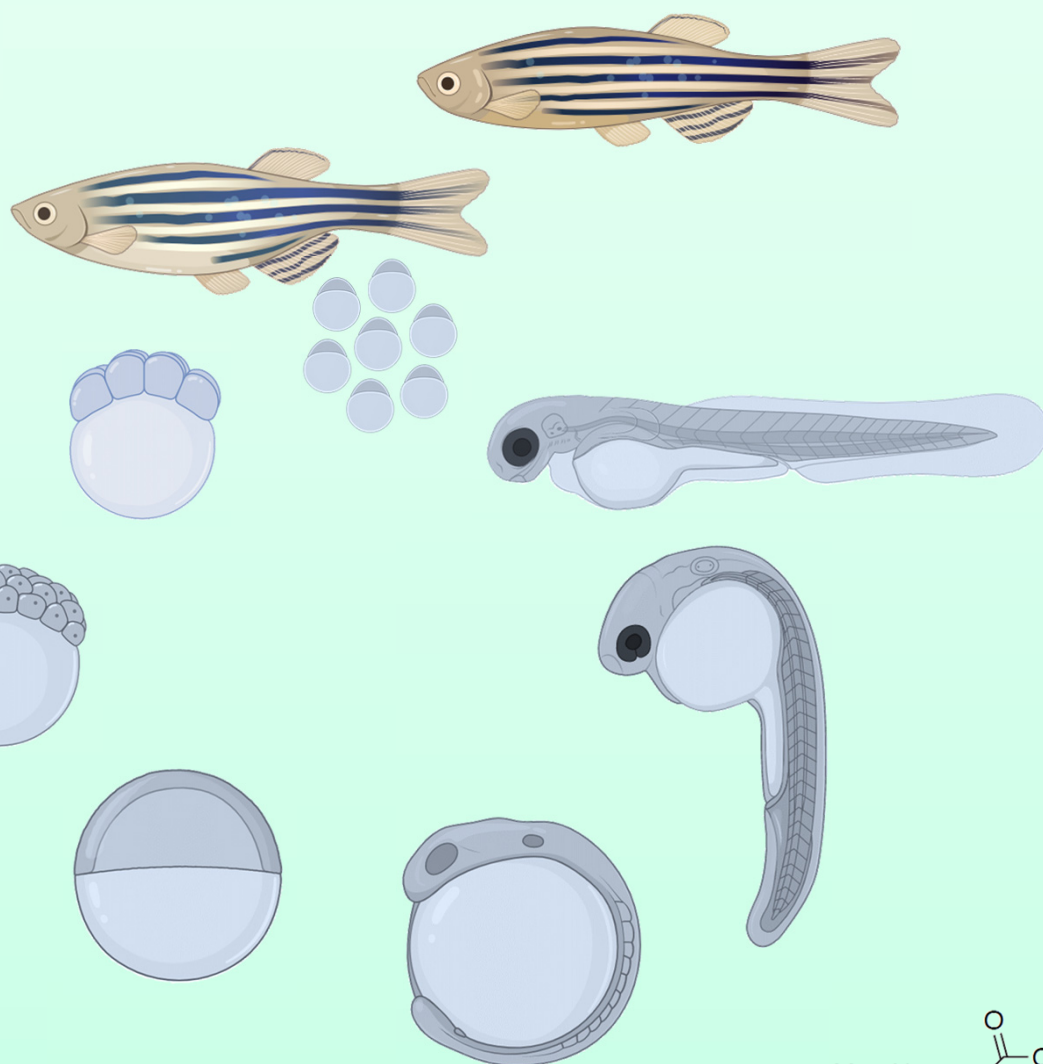


# Estudio de nuevas alteraciones moleculares relacionadas con los efectos sistémicos de las drogas de abuso en pez cebra



**Andrés Ángel Calderón García**  
Salamanca, 2020





# **Estudio de nuevas alteraciones moleculares relacionadas con los efectos sistémicos de las drogas de abuso en pez cebra**

**Memoria presentada por**  
**Andrés Ángel Calderón García**  
**para optar al título de Doctor por la**  
**Universidad de Salamanca.**

**Supervisado por**  
**Dra. Verónica González Núñez**

**Salamanca, 2020**





**DÑA. VERÓNICA GONZÁLEZ NÚÑEZ, CON D.N.I. 07991807C, PROFESORA CONTRATADA DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA, Y MIEMBRO DEL INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEON (INCYL),**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo titulado *"Estudio de nuevas alteraciones moleculares relacionadas con los efectos sistémicos de las drogas de abuso en pez cebra"*, que presenta el doctorando Andrés Ángel Calderón García, describe el trabajo realizado durante los últimos cuatro años bajo su dirección en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León, de la Universidad de Salamanca. Dicha tesis reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea defendida ante el tribunal correspondiente y optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

Salamanca a 2 de Junio de 2020.

Fdo: Veronica Gonzalez-Nunez Ph.D  
Profesora Contratada Doctor  
Dept. Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Medicina  
Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL). Lab 3  
Universidad de Salamanca, España  
e-mail: vgnunez@usal.es  
Tel: +34 923294500 ext.5337



Esta tesis doctoral ha sido financiada por el Gobierno de España, Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO AGL2015-68330-C2-2-R), titulado *“Aplicación a la biología reproductiva del estudio de los mecanismos implicados en la modulación dopaminérgica del sistema de recompensa por estímulos naturales y por drogas”*.



Andrés Ángel Calderón García ha obtenido un contrato para la Formación de Personal Investigador por parte de la Universidad de Salamanca cofinanciado por el Banco Santander.







*Esta tesis doctoral va dedicada a mis padres, a mi  
hermano, a Belén y a Verónica, sin cuyo apoyo  
no podría haber hecho este trabajo.*



*“Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,  
y pensar lo que nadie más ha pensado”.*

*Albert Szent-Györgyi*



#### **Nota aclaratoria 1**

En esta tesis doctoral se pueden encontrar varios términos en inglés debido al uso extendido de esta lengua en la ciencia, y en las herramientas bioinformáticas utilizadas. La dificultad de traducir correctamente algunos términos al español nos ha llevado en algunos momentos a emplear su forma original en inglés.

#### **Nota aclaratoria 2**

La nomenclatura de los genes y proteínas mencionados en este trabajo se adapta a las normas internacionales establecidas por bases de datos como *HGNC (Hugo Gene Nomenclature Comitee)*, *MGI (Mouse Genome Informatics)* y *ZFIN (The Zebrafish Model Organism Database)*. Por lo tanto, las proteínas de humano, rata y ratón se escriben con mayúsculas. Los genes de humano aparecen en mayúsculas y cursiva, mientras que los genes de modelos murinos se escriben en minúsculas y cursiva. Por último, todas las proteínas de pez cebra se escriben con la primera letra en mayúscula. Los genes de este modelo se nombran en cursiva y en minúscula.

#### **Nota aclaratoria 3**

En las citas bibliográficas se puede encontrar el término en inglés “*and*”, así como el término en latín “*et al*” debido al empleo del estilo Harvard a la hora de citar la bibliografía.



# ABREVIATURAS

**5-hmeC:** 5-hidroximetilcitosina.

**5-meC:** 5-metilcitosina.

**ADHD:** Trastorno de Hiperactividad con Déficit de Atención.

**AP-1:** Factor de transcripción activador de proteína-1.

**cAMP:** Adenosin monofostato cíclico.

**cDNA:** DNA copia.

**CETP:** Proteína de transferencia de ésteres de colesterol en plasma.

**CGRP:** Péptido relacionado con el gen de la calcitonina.

**CREB:** Elemento de unión en respuesta a cAMP.

**DAG:** Diacilglicerol.

**ddH<sub>2</sub>O:** Agua bidestilada.

**DNMT:** DNA metiltransferasa.

**dNTP:** Deoxinucleósido trifosfato.

**dpf:** Días post fecundación.

**dsDNA:** DNA de doble cadena.

**EAC:** Enfermedad de las arterias coronarias.

**EDADES:** Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España.

**ESI-MS:** Espectrómetro de masas con ionización por electrospray en modo positivo.

**EST:** *Expressed Sequence Tags*.

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropina.

**GPCR:** Receptores acoplados a proteínas G.

**GSH:** Niveles de glutatión.

**H3K9me3:** Trimetilación de la Lys<sup>9</sup> en la histona H3.

**HAND:** Trastorno neurocognitivo asociado al VIH.

**HDL:** Lipoproteína de alta densidad.

**hpf:** Horas post fecundación.

**HRP:** Peroxidasa de rábano.

**IAM:** Infarto agudo de miocardio.

**IEG:** Genes de expresión temprana, del inglés *immediate early genes*.

**IP<sub>3</sub>:** Inositol 1,4,5-trisfosfato.

**IPTG:** Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.

**KEGG:** *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*.

**KID:** Dominio inducible por kinasas.

**LC:** Locus ceruleus.

**LCAT:** Lecitina-colesterol acil transferasa.

**LINE-1:** *Long interspersed element-1*.

**LPL:** Lipoproteína lipasa.

**MAPK:** Proteínas kinasas activadas por mitógenos.

**MDMA:** 3,4-metilendioxi-metanfetamina.

**MeCP:** Proteína de unión a citosinas metiladas.

**M3G:** Morfina-3-glucurónido.

**M6G:** Morfina-6-glucurónido.

**NAc:** Núcleo accumbens.

**NET:** Transportador de noradrenalina.

**OATP2:** Proteína transportadoras de aniones orgánicos 2.

**OEDA:** Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones.

**OFC:** Corteza orbitofrontal.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**PAG:** Sustancia gris periacueductal.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PIP<sub>2</sub>:** Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato.

**PKA:** Proteína kinasa A.

**PLC:** Fosfolipasa C.

**PP1C:** Proteína fosfatasa-1.

**PP2A:** Fosfatasa 2a.

**PP2C:** Fosfatasa 2c.

**QM:** Quilomicrones.

**Rf:** Movilidad electroforética.

**RT:** Temperatura ambiente.

**RVM:** Región ventromedial del bulbo.

**SDS:** Dodecil sulfato sódico.

**SERT:** Transportador de serotonina.

**SNC:** Sistema Nervioso Central.

**SNP:** Sistema Nervioso Periférico.

**TAG:** Triglicéridos o triacilglicéridos.

**TBS:** Tampón Tris salino.

**TEMED:** Tetrametiletilendiamina.

**TF:** Factor de transcripción.

**TFBSs:** Sitios de unión para factores de transcripción.

**UNODC:** Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.

**UGT:** difosfoglucuronosiltransferasas.

**VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad.

**VTA:** Área tegmental ventral.

**X-Gal:** 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil β-D-Galactopiranosido





# ÍNDICE

<b>Introducción</b>	1
1. Definición de adicción. Conceptos de tolerancia y dependencia	1
2. Clasificación de las drogas de abuso	2
3. La morfina como droga de abuso	6
3.1 <i>Reseña histórica sobre el uso de la morfina</i>	6
3.2 <i>Farmacología de la morfina</i>	7
3.3 <i>Absorción, distribución y metabolismo de la morfina</i>	8
3.4 <i>Los receptores opioides</i>	9
3.5 <i>Efectos secundarios de la morfina: tolerancia y dependencia</i>	11
3.6 <i>Efectos moleculares tras un consumo agudo de opioides</i>	12
3.7 <i>Alteraciones moleculares producidas por el consumo crónico de morfina</i>	13
3.8 <i>Efectos adictivos de la morfina</i>	14
3.9 <i>Mecanismos epigenéticos de la tolerancia y dependencia de la morfina</i>	15
4. La cocaína como droga de abuso	15
4.1 <i>Aspectos históricos del uso de la cocaína</i>	16
4.2 <i>Consumo y producción de cocaína</i>	17
4.3 <i>Vías de administración y formas de abuso de la cocaína</i>	18
4.4 <i>Metabolismo de la cocaína</i>	19
4.4.1 <i>Efectos fisiológicos a corto plazo del consumo de cocaína</i>	20
4.4.2 <i>Efectos fisiológicos a largo plazo del consumo de cocaína</i>	21
4.4.3 <i>Toxicidad y policonsumo de cocaína</i>	23
4.5 <i>Tratamiento farmacológico de la adicción a la cocaína</i>	24
4.6 <i>Mecanismos epigenéticos de la tolerancia y dependencia a la cocaína</i>	24
5. El sistema dopaminérgico de recompensa	27
5.1 <i>La dopamina: Función y síntesis</i>	27
5.2 <i>Principales vías dopaminérgicas y receptores dopaminérgicos</i>	29
5.3 <i>El papel del sistema de recompensa en la adicción a las drogas</i>	30
5.3.1 <i>Activación del sistema de recompensa por las drogas de abuso</i>	31
6. Factores de transcripción relacionados con la adicción: CREB y FOS	32
6.1 <i>Efecto de la morfina sobre los TFs</i>	33
6.2 <i>Efecto de la cocaína sobre los TFs</i>	34
7. Pez cebra como animal de experimentación para el estudio de las drogas de abuso	34
7.1 <i>Resultados previos y experiencia del grupo de investigación</i>	35
<b>Hipótesis</b>	37
<b>Objetivos</b>	39
<b>Materiales y Métodos</b>	41
1. Mantenimiento de peces cebra adultos	41
2. Cría de embriones	42
3. Administración de tratamientos	43
4. Administración de drogas a peces cebra adultos	44
5. Cría de embriones de pez cebra expuestos a morfina y cocaína durante todo el desarrollo embrionario	45
6. Análisis Toxicológico	45

7. Determinación de los niveles de morfina, cocaína y benzoilecgonina .....	46
8. Determinación de la frecuencia cardíaca .....	47
9. Extracción de cerebros y sangre de peces cebra adultos .....	47
10. Determinación de los niveles de dopamina .....	48
11. <i>Western Blot</i> .....	49
12. Determinación <i>in silico</i> de sitios de unión en el promotor regulador .....	51
13. Extracción de RNA .....	52
14. Análisis transcriptómico por RNAseq .....	52
15. Análisis bioinformático del RNAseq .....	53
16. Caracterización funcional de los genes desregulados .....	53
16.1 <i>GO Terms</i> .....	54
16.2 <i>REACTOME</i> .....	54
16.3 <i>PANTHER</i> .....	54
17. Retrotranscripción .....	54
18. PCR a Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR) .....	55
19. Estudios de metilación global .....	56
19.1 <i>Determinación in silico de Islas CpG</i> .....	58
20. Determinación de los niveles totales de colesterol (CHO), triglicéridos (TAG) y hemoproteínas .....	58
21. Clonación de genes de lenguado senegalés .....	59
22. Reacción de ligación .....	60
23. Transformación de bacterias supercompetentes .....	60
24. Análisis de las colonias transformantes .....	60
25. Secuenciación automática de DNA .....	61
26. Crecimiento de cultivos en medio líquido y preparación de <i>stocks</i> .....	61
27. Estudios de proteómica .....	62
28. Proteinograma sérico .....	63
29. Análisis Estadístico .....	63

## **Resultados** ..... 65

1. Análisis de la tasa de mortalidad y de aparición de malformaciones por exposición a drogas .....	65
1.1 <i>Análisis de la tasa de mortalidad y de malformaciones</i> .....	65
1.2 <i>Alteraciones de la frecuencia cardíaca causadas por la morfina y cocaína</i> .....	67
2. Análisis de los niveles de droga asimilada por embriones de pez cebra .....	68
3. Determinación de los niveles de dopamina en extractos de embriones control y expuestos a drogas .....	70
4. Análisis del efecto de la morfina y cocaína sobre la expresión de la tirosina hidroxilasa ....	71
4.1 <i>Estudios in silico de los sitios de unión en el promotor regulador</i> .....	72
5. Análisis de los cambios en la activación del sistema de recompensa entre embriones control y tratados con drogas. Estudio de los niveles de Fos y Creb.....	74
5.1 <i>Análisis de la expresión de proteínas de la familia Fos</i> .....	75
5.2 <i>Estudios in silico de sitios de unión en el promotor regulador</i> .....	78
5.3 <i>Análisis de la expresión de pCreb y Creb</i> .....	78
6. Análisis transcriptómico del efecto de las drogas de abuso en embriones de pez cebra (RNAseq) .....	80
6.1 <i>Análisis de enriquecimiento funcional</i> .....	84
6.2 <i>Mapas de interacción</i> .....	90
7. Validación de los resultados del análisis transcriptómico .....	92

8. Estudio proteómico en embriones expuestos a morfina y cocaína .....	96
9. Análisis <i>in silico</i> del promotor regulador de genes alterados por la exposición a drogas de abuso .....	97
10. Estudio del efecto de las drogas sobre los niveles de metilación del DNA .....	99
10.1 Análisis <i>in silico</i> de la existencia de islas CpG en el promotor regulador de los genes cuya expresión se ve modificada por morfina y cocaína .....	100
11. Alteraciones de metabolitos de bajo peso molecular relacionadas con la exposición a morfina y cocaína .....	101
12. Ensayos en pez cebra adulto .....	103
12.1 Análisis de la expresión de proteínas en cerebros de peces cebra adulto expuestos a morfina y cocaína .....	103
12.2 Análisis de expresión de transcritos relacionados con la exposición a drogas .....	105
12.3 Estudio de los niveles de metilación global .....	108
12.4 Ensayos de qPCR para la determinar la expresión de genes de interés en ejemplares de pez cebra adultos, expuestos a morfina y cocaína durante la etapa embrionaria .....	109
13. Extrapolación de los resultados a otra especie de interés piscícola: el lenguado senegalés ( <i>Solea senegalensis</i> ) .....	110
13.1 Clonación de genes de lenguado senegalés .....	111
13.2 Análisis de la expresión de proteínas de interés en cerebros de ejemplares adultos de lenguado senegalés salvaje (Wt) y su F1. Ensayos de Western Blot ...	113
13.3 Análisis de la movilidad electroforética de proteínas séricas en muestras de lenguado senegalés .....	115
13.4 Estudio proteómico con muestras procedentes de lenguado senegalés salvajes y F1 .....	116
<b>Discusión</b> .....	117
1. Objetivo 1: Validar un protocolo experimental para determinar el efecto de las drogas de abuso durante el desarrollo embrionario del pez cebra .....	118
2. Objetivo 2: Determinar el efecto de la exposición a morfina y cocaína sobre la señalización dopaminérgica relacionada con el sistema de recompensa .....	119
3. Objetivo 3: Analizar el efecto de la exposición a morfina y cocaína sobre el transcriptoma, y establecer si dichos cambios se ven reflejados en otros niveles de la información biológica.....	123
4. Objetivo 4: Establecer si los efectos moleculares de la exposición a morfina y cocaína observados en la etapa embrionaria se manifiestan igualmente en ejemplares adultos de pez cebra tratados con las mismas drogas .....	133
5. Objetivo 5: Examinar la posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos en el pez cebra a otros contextos biológicos, como es la disfunción reproductiva del lenguado senegalés ( <i>Solea senegalensis</i> ) .....	137
6. Perspectivas Futuras .....	139
<b>Conclusiones</b> .....	141
<b>Bibliografía</b> .....	143
<b>Anexos</b> .....	A.1



# INTRODVCCIÓN



En esta tesis doctoral vamos a abordar el estudio del efecto de las drogas de abuso (morfina y cocaína) a nivel molecular durante el desarrollo embrionario, así como en la edad adulta, empleando el pez cebra como modelo experimental. Nuestro estudio presenta un enfoque novedoso, ya que la mayoría de los trabajos realizados previamente con estas sustancias se centran en núcleos específicos del cerebro. Hasta el momento, y de acuerdo con la bibliografía científica existente, apenas se han estudiado los efectos que las drogas pueden tener sobre embriones completos ni a nivel global del cerebro.

### 1. Definición de adicción. Conceptos de tolerancia y dependencia

La definición de adicción ha sufrido multitud de cambios a lo largo de los años. Según la *American Society of Addiction Medicine* (ASAM), se define adicción como *“una enfermedad cerebral primaria y crónica que afecta a los circuitos de recompensa, memoria, motivación y otros circuitos relacionados”*. Tras un consumo o uso continuado de una sustancia o hábito, se produce una disfunción en estos circuitos, que conlleva una serie de manifestaciones físicas, psicológicas y sociales, características de todo proceso adictivo. Esto se refleja en una búsqueda patológica de aquellas sustancias o comportamientos que aportan al individuo esa sensación de recompensa y/o alivio (American Society of Addiction Medicine, 2019).

El diccionario de la Real Academia Española define la adicción como *“la dependencia de sustancias o actividades nocivas para la salud o el equilibrio psíquico”* (Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE, 2019), y según la Organización Mundial de la Salud (OMS) *“la adicción es el consumo repetido de una o varias sustancias psicoactivas, hasta el punto de que el consumidor (denominado adicto) se intoxica periódicamente o de forma continua, muestra un deseo compulsivo de consumir la sustancia (o las sustancias) preferida, tiene una enorme dificultad para interrumpir voluntariamente o modificar el consumo de la sustancia y se muestra decidido a obtener sustancias psicoactivas por cualquier medio”* (World Health Organization, 1994; "Lexicon of alcohol and drug terms, World Health Organization", 2010). Por otro lado, Nestler & Lüscher, 2019, definen la adicción como *“una enfermedad en la cual, tras un periodo de consumo recreacional, un conjunto de individuos desarrolla un uso compulsivo que no se detiene a pesar de las consecuencias perjudiciales”*.

Independientemente de la definición utilizada, todo proceso adictivo de cualquier etiología presenta las siguientes características fundamentales (American Society of Addiction Medicine, 2019):

Pérdida de control de la conducta.
Necesidad irresistible de consumo (“mono” o <i>craving</i> ) de sustancias o de comportamientos gratificantes e incapacidad de abstinencia.
Negación o falta de reconocimiento de la existencia de problemas significativos en la conducta y en las relaciones interpersonales.
Respuesta emocional disfuncional.
Alteración de la neurotransmisión de circuitos cerebrales subyacentes (núcleo accumbens [NAc], córtex cingulado anterior y amígdala).
Modificación de las prioridades motivacionales e imposición de una conducta sobre el cuidado de la propia salud.

## Introducción

La quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría (DSM-V) ha sustituido el término *“adicción”* por *“trastorno adictivo”*. Así, se propone una nueva categoría denominada *“Trastornos relacionados con sustancias y trastornos adictivos”* que se compone a su vez de dos categorías: *“trastornos relacionados con sustancias”* y *“trastornos no relacionados con sustancias”* (American Psychiatric Association, 2013). El capítulo de *“Trastornos relacionados con sustancias”* comprende 9 tipos de drogas: alcohol (1), cafeína (2), cannabis (3), alucinógenos (4), inhalantes (5), opioides (6), sedantes, hipnóticos y ansiolíticos (7), estimulantes (anfetaminas, cocaína y otros (8)) y tabaco (9), así como una décima categoría para nuevas sustancias denominada *“otras sustancias”*. A pesar de que todas estas sustancias tienen distinta naturaleza, todas ellas tomadas en exceso, producen la activación del sistema de recompensa (American Psychiatric Association, 2013).

La palabra adicción va de la mano de otros conceptos relacionados con ella, como son tolerancia, dependencia y síndrome de abstinencia. La tolerancia es la disminución de la respuesta ante a una dosis concreta de droga o fármaco, y está producida por el uso continuado de la misma; esto supone un aumento de la dosis para mantener la efectividad terapéutica. La dependencia es el conjunto de manifestaciones fisiológicas, comportamentales y cognoscitivas en las que el consumo de una sustancia adquiere la máxima prioridad para un individuo. La manifestación más característica del síndrome de dependencia es el intenso deseo, y en ocasiones insuperable, de ingerir sustancias, denominado coloquialmente *“mono”* o *craving* en inglés. Por último, el síndrome de abstinencia es el conjunto de signos y síntomas que aparecen en los individuos al suspender o reducir el consumo de una sustancia o droga que se ha consumido previamente de forma repetida (Wise, 1998).

Actualmente, la adicción es uno de los principales problemas de salud pública que cada vez afecta a un mayor número de personas, sobre todo jóvenes. Además de deteriorar la calidad de vida de las personas que padecen esta patología, la adicción conlleva un importante gasto socioeconómico. A modo de ejemplo ilustrativo, cabe mencionar que en el año 2017 hubo 20.168 admisiones para tratamiento de desintoxicación de cocaína en España, y se notificaron 4.293 episodios de urgencias relacionados con el consumo no terapéutico o no médico de alguna droga, el 50,2% de ellas relacionadas con el consumo de cocaína (Informe EDADES, 2019).

## 2. Clasificación de las drogas de abuso

De acuerdo con la OMS el término *“droga”* es muy variado. En medicina se refiere a toda sustancia con potencial para prevenir o curar una enfermedad o aumentar la salud física o mental, mientras que, en farmacología se define como toda sustancia química que modifica los procesos fisiológicos y bioquímicos de los tejidos o los organismos. Por otro lado, el término *“droga de abuso o droga ilegal”* se define como *“sustancia psicoactiva cuya producción, venta o consumo están prohibidos, incluyendo medicamentos autorizados fuera de los canales legalmente permitidos”* (World Health Organization, 1994).



Las drogas se pueden clasificar de acuerdo a diferentes parámetros o criterios, como es su origen o procedencia, sus efectos o por su impacto o estatus social. Para la OMS, la clasificación más apropiada para las drogas de abuso es la que tiene en cuenta el efecto que éstas producen en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Figura 1).

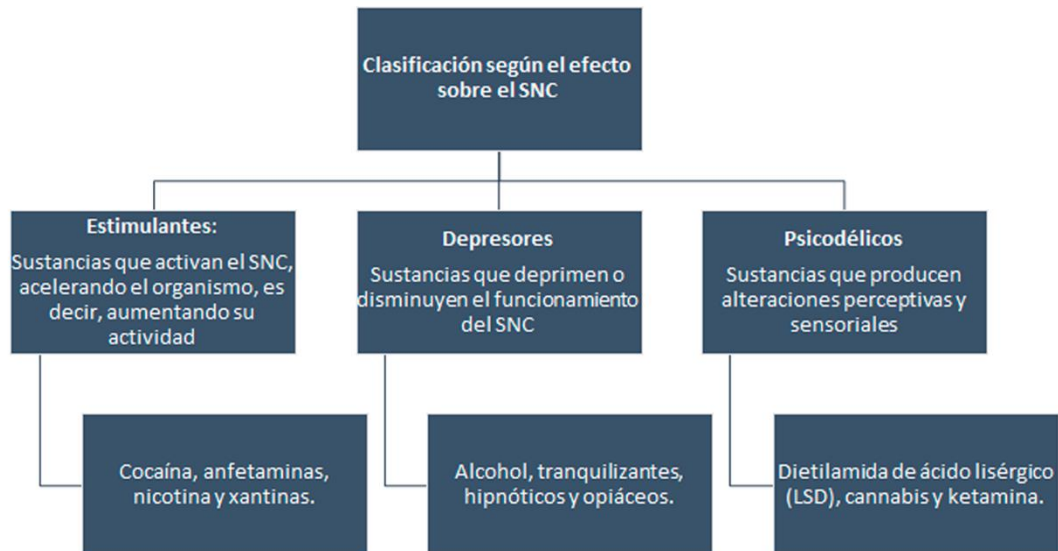


Figura 1. Clasificación de las drogas según el efecto que producen en el SNC (OMS, 2004; Villalobos, 2010).

Por otro lado, las drogas se pueden clasificar de acuerdo a su estatus legal. Aunque esta legalidad depende de la legislación de cada país, se pueden encontrar dos grandes tipos de drogas (Figura 2).

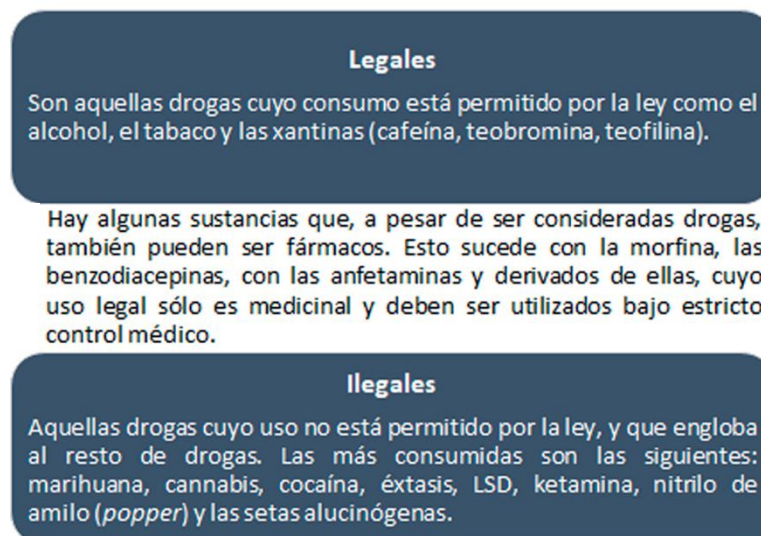


Figura 2. Clasificación de las drogas según el estatus social que presentan (OMS, 2004; Villalobos, 2010).

En este punto, cabe destacar que la legalidad de las drogas no se corresponde con su peligrosidad ya que, aunque sean legales, el abuso de estas drogas puede ser muy perjudicial para la salud.

## Introducción

Por último, la forma más popular y coloquial de clasificar a las drogas es según la percepción de su peligrosidad e impacto social y sanitario (Figura 3).

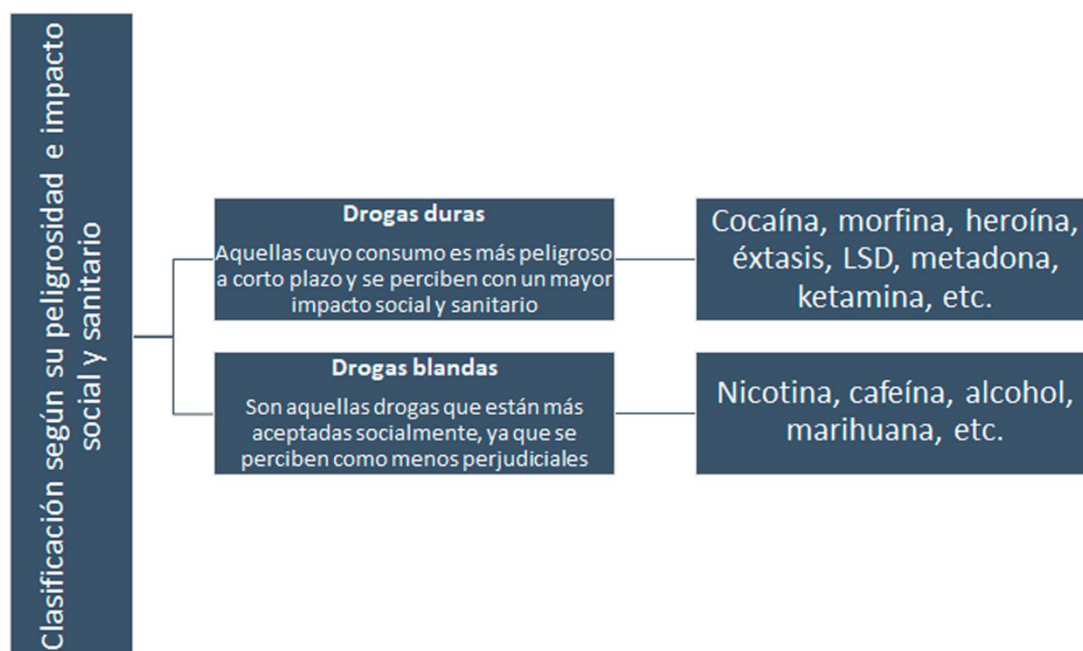


Figura 3. **Clasificación de las drogas según la percepción de su peligrosidad e impacto social y sanitario** (OMS, 2004; Villalobos, 2010).

Las drogas constituyen un serio problema de salud pública. Por ello, el Observatorio español de las Drogas y las Adicciones (OEDA, Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social) elabora anualmente el informe EDADES a partir de la Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España. El último informe EDADES, del año 2019, hace referencia a los datos recopilados en 2017 (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2019). A día de hoy, los datos sobre el consumo de drogas en España son más que alarmantes, ya que según este informe el 91,2% de la población de 15 a 64 años manifiesta haber consumido bebidas alcohólicas alguna vez en la vida, siendo el alcohol la sustancia psicoactiva con mayor prevalencia de consumo. Por detrás del alcohol, se encuentra el tabaco como la segunda sustancia psicoactiva más consumida en España, ya que el 69,7% de la población ha fumado tabaco alguna vez en la vida (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2019).

En cuanto al consumo de drogas ilegales, el cannabis es la droga más consumida en España (35,2%), que continúa con una tendencia creciente de consumo desde 2013 alcanzando actualmente su máximo valor histórico. La cocaína en polvo es la segunda droga ilegal más consumida, ya que el 10% de la población de 15 a 64 años reconoce haberla consumido alguna vez en la vida. Igualmente se ha producido un incremento del 1,1% en el porcentaje de consumo con respecto a los valores de 2015 (Tabla 1).

Tabla 1. **Prevalencia de consumo de sustancias psicoactivas alguna vez en la vida en la población de 15-64 años (%) en España, 1995-2017.** Fuente: Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2019).

	1995	1997	1999	2001	2003	2005	2007	2009	2011	2013	2015	2017
Tabaco	-	69,7	64,9	68,4	68,9	69,5	68,5	75,0	71,7	73,1	72,5	69,7
Alcohol	-	90,6	87,3	89,0	88,6	93,7	88,0	94,2	90,9	93,1	93,5	91,2
Hipnosedantes con o sin receta	-	-	-	-	-	8,7	15,4	13,4	19,5	22,2	18,7	20,8
Hipnosedantes sin receta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7	4,1	3,0
Cannabis	14,5	22,9	19,6	23,8	29,0	28,6	27,3	32,1	27,4	30,4	31,5	35,2
Éxtasis	2,0	2,5	2,4	4,0	4,6	4,4	4,3	4,9	3,6	4,3	3,6	3,6
Alucinógenos	2,1	2,9	1,9	2,8	3,0	3,4	3,8	3,7	2,9	3,8	3,8	4,5
Anfetaminas/speed	2,3	2,7	2,2	2,9	3,2	3,4	3,8	3,7	3,3	3,8	3,6	4,0
Cocaína (polvo y/o base)	-	-	-	-	-	-	8,3	10,2	8,8	10,3	9,1	10,3
Cocaína en polvo	3,4	3,4	3,1	4,8	5,9	7,0	8,0	10,2	8,8	10,2	8,9	10,0
Cocaína base	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,6	1,8	0,9	0,9	1,0	0,8	1,3

En cuanto a los analgésicos opioides, su elevado consumo se está convirtiendo en un serio problema de salud a escala mundial en los últimos años. En España, el 14,5% de la población de 15 a 64 años reconoce haber consumido analgésicos opioides en alguna ocasión, estando más extendido entre las mujeres. Con respecto al último año, la prevalencia del consumo se sitúa en el 6,7%, reduciéndose al 2,9% cuando nos referimos al consumo en el último mes, tal y como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. **Prevalencia de consumo de analgésicos opioides en la población de 15-64 años, según sexo y edad (%) en España, 2017.** Fuente: OEDA. Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES). Leyenda: T: Total, H: Hombres, M: Mujeres (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2019).

	15-64			15-24			25-34			35-44			45-54			55-64		
	Total	H	M	Total	H	M	Total	H	M	Total	H	M	Total	H	M	Total	H	M
Alguna vez en la vida	14,5	13,1	16,0	7,6	6,6	8,6	11,4	11,4	11,4	15,9	13,6	18,3	17,3	15,1	19,6	17,6	16,6	18,6
Últimos 12 meses	6,7	5,9	7,4	3,7	3,2	4,3	5,9	5,9	5,9	7,1	6,2	8,0	7,6	6,3	8,8	7,9	7,0	8,8
Últimos 30 días	2,9	2,3	3,4	1,0	0,8	1,3	2,1	1,6	2,6	3,1	2,6	3,7	3,5	3,0	4,1	3,9	3,2	4,5

Más específicamente, la codeína y el tramadol son los analgésicos con mayor prevalencia de consumo entre la población de 15 a 64 años. En la tabla 3 se puede observar que la prevalencia de consumo de codeína en el último año es del 4,2% y la del tramadol 2,3%. El siguiente analgésico opioide más consumido es la morfina, ya que el 0,7% de la población española lo ha consumido en el último año.

## Introducción

Tabla 3. **Prevalencia de consumo de analgésicos opioides en la población de 15-64 años, según sexo (%) en España, 2017.** Fuente: OEDA. Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EADAES). Leyenda: T: Total, H: Hombres, M: Mujeres (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2019).

	Alguna vez en la vida			Últimos 12 meses			Últimos 30 días		
	Total	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer	Total	Hombre	Mujer
Tramadol	5,2	4,5	5,8	2,3	1,9	2,6	1,1	0,9	1,3
Codeína	10,0	9,1	11,0	4,2	3,8	4,7	1,6	1,2	1,9
Morfina	2,1	2,0	2,3	0,7	-*	-	-	-	-

\*Estos datos no se pueden dar porque no hay suficientes casos en la muestra.

Según el Informe Mundial sobre Drogas emitido por la Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), en el año 2017 se han producido unas 585.000 muertes vinculadas al consumo de drogas en el mundo, frente a las 450.000 calculadas para el año 2015 (ONU, 2019). Asimismo, el mercado ilegal de drogas sigue creciendo.

### 3. La morfina como droga de abuso

La morfina es un alcaloide natural que proviene de la adormidera o planta del opio (*Papaver somniferum*), constituyendo entre el 4-21% de la composición de las cápsulas de dicha planta. De la planta del opio también es posible obtener otros alcaloides como la codeína y la papaverina, utilizados actualmente en la clínica (Devereaux *et al.*, 2018). En la figura 4 se muestra la planta del opio y la estructura química de la morfina.

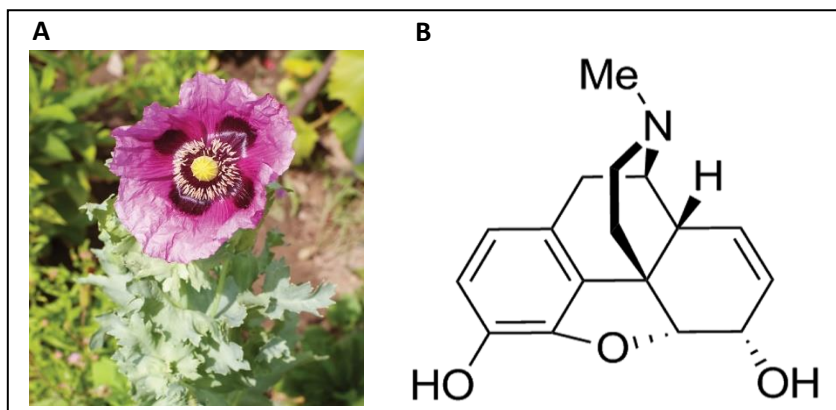


Figura 4. **La morfina.** **A)** Planta del opio (*Papaver somniferum*), de la que se extrae la morfina. Imagen tomada de *La Enciclopedia Britannica*, 2017. **B)** Estructura química de la morfina. Imagen tomada de Devereaux *et al.*, 2018.

#### 3.1 Reseña histórica sobre el uso de la morfina

El uso médico de los opioides tiene una larga historia. El opio era utilizado por los faraones egipcios en torno al 1550 A.C. para calmar el dolor intestinal causado por infecciones de gusanos y para ayudar a los bebés a que dejaran de llorar. En la mitología griega, ya se usaba el opio para aliviar el dolor, y el filósofo Teofrasto fue el primero en referirse al opio como un narcótico al cual llamó “meconio”. Los efectos narcóticos del opio ya fueron mencionados por los poetas romanos Ovidio y Virgilio. Por otro lado, la cultura árabe usaba el opio para el tratamiento contra la diarrea y los problemas oculares.

La morfina fue aislada por primera vez en 1805 cuando el farmacéutico alemán Friedrich Sertürner (1783-1841) extrajo el principal componente activo de la planta del opio, que llamó morfina en honor a Morfeo, el dios griego del sueño. A partir de este momento, la morfina se empezó a utilizar como analgésico y anestésico, si bien los efectos narcóticos y “gratificantes” ya eran conocidos en el Imperio Griego y Romano (Devereaux *et al.*, 2018).

Pocas moléculas en la historia han tenido tanto impacto como la morfina. La morfina ha revolucionado el tratamiento farmacológico del dolor, pero desgraciadamente esta sustancia es un ejemplo de droga de abuso que ha enfrentado sociedades a lo largo de los siglos, como fueron las guerras del opio en China entre 1839-1842 y 1856-1860 (Feige and Miron, 2005). En el siglo XIX, uno de los capítulos más oscuros de relevancia cultural en la historia de los opioides fue el descubrimiento de la diacetilmorfina o heroína por la compañía farmacéutica alemana Bayer en 1898. En un principio se comercializó como un sustituto no adictivo de la morfina con poder antitusígeno y analgésico, pero finalmente se descartó su uso médico porque presentaba un poder adictivo mucho mayor que el de la propia morfina (Snyder, 1996). De hecho, los altos índices de adicción que producía la heroína llevaron al control de su venta y distribución en EEUU en 1914 (Devereaux *et al.*, 2018). Mas actualmente se ha observado un aumento del consumo de la oxycodona, un análogo opioide cuyo uso recreativo causó miles de muertes por sobredosis en EEUU en la década del 2000 (Severtson *et al.*, 2013; Madras, 2018).

En 2017, debido a la gravedad de la situación y al elevado número de muertes por sobredosis de opioides en EEUU (más de 64.000 muertos al año), se declaró el estado de emergencia sanitaria en este país. Actualmente, a pesar del esfuerzo de los gobiernos y de la sociedad por reducir el consumo de drogas de abuso, el número de personas con trastornos por consumo de opioides aumenta en todo el mundo a ritmo constante. Hoy en día, la dependencia a los opioides es considerada una crisis de salud pública en muchos países. Según la OMS, 275 millones de personas en todo el mundo, el 5,6% de la población global de edad comprendida entre 15 y 64 años, consumió drogas durante 2016, de entre las cuales 34 millones de personas consumieron opioides. En 2015, en torno a 450.000 personas murieron a consecuencia de las drogas en todo el mundo. Por otro lado, las muertes por sobredosis de opioides están creciendo de manera preocupante en todo el mundo, aumentando de 69.000 personas en 2014 a 118.000 en 2015 (World Health Organization., 2018; World Health Organization. Management of Substance Abuse Team., 2018). Además, está siendo especialmente significativo el incremento en la última década del consumo de opioides por madres embarazadas, con la consiguiente la aparición de numerosos casos de síndrome de abstinencia neonatal.

### 3.2 Farmacología de la morfina

La morfina es el opioide más usado en todo el mundo para el tratamiento del dolor, tanto moderado como severo, siendo el tratamiento de esta patología uno de los principales retos de la clínica actual (Stein *et al.*, 2000). En cuanto a su estructura, la morfina es un derivado del fenantreno y una base débil (pKa 7,9) que es muy soluble en el agua en condiciones ácidas y poco soluble en lípidos a pH fisiológico (7,4). Es un agonista del receptor opioide  $\mu$ , con una afinidad de 14 nM para el receptor humano, y el rango de dicha afinidad está conservada entre especies de mamífero (Kilpatrick and Smith, 2005).

## Introducción

La morfina, así como otros agonistas opioides, produce analgesia al unirse y activar los receptores opioides. Más específicamente, la morfina bloquea la transmisión de señales nociceptivas activando la señalización de las neuronas encargadas de modular el dolor en la médula espinal, inhibiendo la transmisión de los nociceptores aferentes primarios a las células de proyección sensorial del asta dorsal. Además, la morfina puede actuar directamente a nivel central sobre los receptores opioides del encéfalo (especialmente en el Área Tegmental Ventral, VTA) (Martin, 1984; Pacifici, 2016). Los efectos de la morfina se asocian principalmente con la activación del receptor  $\mu$  y comprenden la analgesia, así como otra serie de efectos secundarios no deseados como: depresión respiratoria, cefalea, mareos, reducción de la motilidad gastrointestinal, depresión urinaria náuseas, sedación y somnolencia (Stein *et al.*, 1991), además de la elevada adicción que produce. La insuficiencia renal es uno de los mayores problemas clínicos relacionados con la administración de morfina, ya que disminuye la depuración renal, y la acumulación de los metabolitos de la morfina puede conllevar serios problemas de salud, como insuficiencia o fallo renal (Angst *et al.*, 2000).

### 3.3 Absorción, distribución y metabolismo de la morfina

Existen varias formas farmacéuticas de la morfina, ya que está disponible en tabletas, cápsulas, soluciones orales, supositorios y soluciones inyectables. En cuanto a su absorción, la morfina se absorbe casi al 100% en el tracto gastrointestinal después de la administración oral (Devereaux *et al.*, 2018). De acuerdo a estudios farmacológicos en humanos, la constante de absorción de la morfina tras ser introducida por vía oral es de  $6,7-13,6\text{h}^{-1}$  (Sverrisdóttir *et al.*, 2015a), para administración intramuscular  $1,03\text{h}^{-1}$  (Mazoit *et al.*, 2007) y subcutánea  $4,14\text{h}^{-1}$  (Upton *et al.*, 2006). Una vez absorbida, la morfina es rápidamente distribuida por los tejidos bien perfundidos como los pulmones, riñones y el hígado (Spector and Vesell, 1971). Aproximadamente de un 15% a un 35% de la morfina se transporta unida a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina (Ederoth *et al.*, 2004). La biodisponibilidad media que tiene la morfina tras su administración es baja (20-30%), debido al elevado metabolismo hepático; éste representa aproximadamente el 90% de la eliminación de morfina y muestra una alta variabilidad interindividual. La vía metabólica primaria es la conjugación de la morfina con el ácido glucurónico en morfina-3-glucurónido (M3G), que es el principal metabolito del metabolismo de la morfina (45-55% de los metabolitos), y en morfina-6-glucurónido (M6G), que es el analgésicamente activo y constituye el 10-15% de la morfina biotransformada (Christrup, 1997; Sverrisdóttir *et al.*, 2015b) (Figura 5).



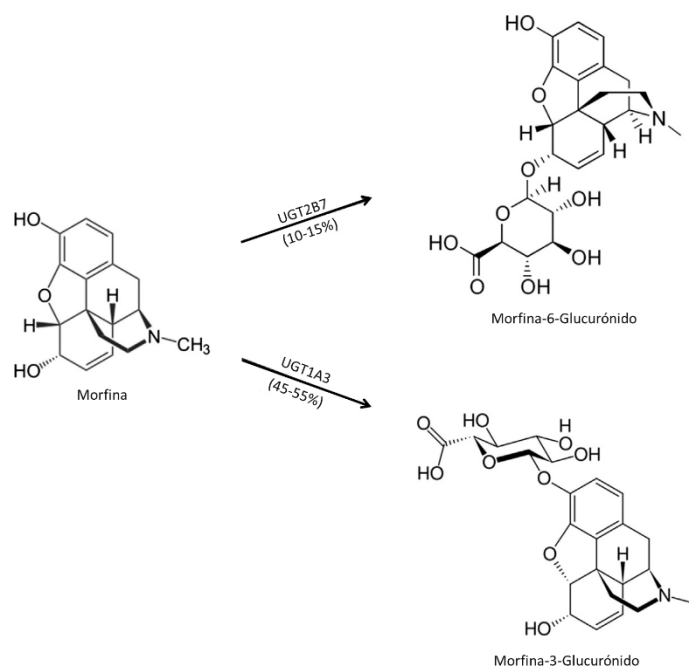


Figura 5. **Rutas metabólicas de la morfina en el hígado.** La morfina se metaboliza por glucuronidación (reacción en fase II) por la acción de las difosfoglucuronosiltransferasas (UGT) UGT2B7 y UGT1A3 en morfina-6-glucurónido (M6G) y morfina-3-glucurónido (M3G) respectivamente. La M3G es el principal metabolito de la morfina, constituyendo el 45-55% del metabolismo de la morfina, mientras que el 10-15% se metaboliza en M6G, que es el metabolito con actividad analgésica. Imagen modificada de Sverrisdóttir *et al.*, 2015b.

En cuanto a su transporte, Bourasset y cols., demostraron en 2003 que el transporte activo de M6G por la proteína transportadoras de aniones orgánicos 2 (OATP2) y el transportador de glucosa GLUT1, puede ser el mecanismo responsable del transporte de este metabolito hidrófilo desde la sangre al cerebro a través de la barrera hematoencefálica. Finalmente, en cuanto a su excreción, aproximadamente el 10% de la morfina es excretada como morfina mientras que el 45-55% es excretada como M3G, el 10-15% como M6G y el 5% como otros metabolitos menores (Lotsch *et al.*, 1999).

A medida que aumenta la dosis de morfina, también aumenta el grado de analgesia que produce hasta que causa anestesia. El efecto analgésico de la morfina por vía intravenosa es relativamente lento (6-30'), fundamentalmente debido a su baja solubilidad en lípidos y a su lenta tasa de penetración a través de la barrera hematoencefálica. Por otro lado, la vida media de eliminación de la morfina en adultos es corta (3-4h), limitando así la duración de la analgesia y determinando que la pauta correcta de la morfina es de una toma cada 4h (Pacifi, 2016).

### 3.4 Los receptores opioides

Los receptores opioides pertenecen a la superfamilia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR). Existen 3 tipos de receptores opioides,  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ , y todos ellos comparten una misma estructura general. En la cara extracelular de la membrana se encuentra el extremo N-terminal además de 3 lazos o *loops*, siendo el segundo y

## Introducción

el tercero de ellos los que establecen la selectividad de ligando. El bolsillo de unión al ligando se localiza en el interior de las regiones transmembrana y en la cara citosólica se encuentra el extremo carboxilo-terminal y otros 3 lazos, que son los encargados de transducir las señales a la maquinaria intracelular (Waldhoer *et al.*, 2004). En la figura 6 aparece tanto la estructura general de los receptores opioides como la estructura específica de cada uno de ellos.

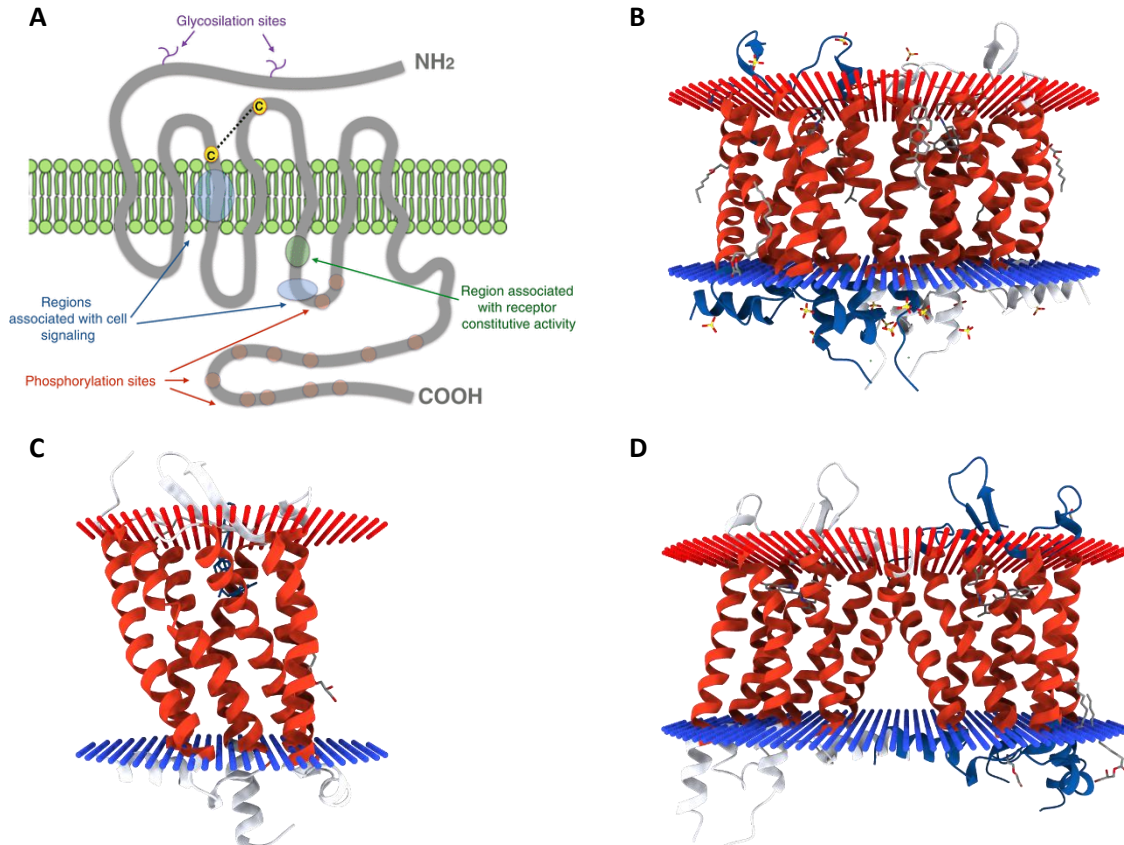


Figura 6. **Representación esquemática de los receptores opioides.** **A)** Esquema de la estructura general de un receptor opioide, miembro de la superfamilia de receptores opioides acoplados a proteínas G (GPCRs). Imagen tomada de Cruz and Granados-soto, 2016 . **B)** Estructura del receptor opioide  $\mu$  unido a un agonista de la morfina. Imagen tomada de la base de datos *RCSB ProteinDataBank* (ID code 4DKL) (Manglik *et al.*, 2012). **C)** Receptor opioide  $\delta$  unido al tetrapéptido DIPP-NH<sub>2</sub> Imagen tomada de la base de datos *RCSB ProteinDataBank* (ID code 4RWA)(Fenalti *et al.*, 2015) . **D)** Receptor opioide  $\kappa$  unido al antagonista JD1c. Imagen tomada de la base de datos *RCSB ProteinDataBank* (ID code 4DJH), (Wu *et al.*, 2012).

De manera natural, los receptores opioides son activados por péptidos endógenos como  $\beta$ -endorfinas, endomorfina, dinorfina y encefalinas. Las endomorfina son dos tetrapéptidos (endomorfina-1 y endomorfina-2) con una elevada afinidad y selectividad por el receptor opioide  $\mu$ , que se localizan en el SNC y en el Periférico (SNP), y están involucrados en los procesos de analgesia y recompensa. Por su parte, las dinorfina ejercen sus efectos a través del receptor  $\kappa$ , ya que presentan baja afinidad por los receptores  $\mu$  y  $\delta$ . Finalmente, las encefalinas (principalmente Met-enkefalina y Leu-enkefalina) llevan a cabo su acción fundamentalmente a través del receptor  $\delta$ , aunque también tienen afinidad por el receptor  $\mu$  (Listos *et al.*, 2019).



Los receptores opioides se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC y Periférico (SNP), presentando una mayor densidad en aquellas áreas relacionadas con: 1) la transmisión de dolor: tálamo, región rostral y ventromedial del bulbo (RVM), sustancia gris periacueductal (PAG) y asta dorsal de la médula espinal; 2) en el sistema de recompensa: NAc, VTA y corteza prefrontal; así como 3) otras áreas del cerebro como el hipotálamo, amígdala, globo pálido, hipocampo y bulbo olfatorio, entre otros (Gray *et al.*, 2006).

Se sabe que la morfina tiene una mayor afinidad por el receptor opioide  $\mu$ , a través del cual media la analgesia, así como la depresión respiratoria y los efectos adversos gastrointestinales (Sverrisdóttir *et al.*, 2015b). Por otro lado, la morfina también se une a los receptores opioides  $\kappa$ , los cuales se cree que median la analgesia periférica (Wang *et al.*, 2010), y a los receptores opioides  $\delta$ , que participan en la analgesia espinal y supraespinal, así como en la reducción de la motilidad y secreción gastrointestinal (Sverrisdóttir *et al.*, 2015b). No obstante, la morfina se une con mayor afinidad al receptor  $\mu$  que a los receptores  $\kappa$  y  $\delta$ , aproximadamente con un orden de diferencia (Kilpatrick and Smith, 2005).

En cuanto a la analgesia producida por los opioides, se debe fundamentalmente a la activación del receptor  $\mu$  en el SNC y SNP, ya que estos receptores están localizados en aquellas regiones subcorticales del cerebro donde se originan las vías descendentes de control del dolor: el tálamo, la PAG y la RVM, así como en el asta dorsal de la médula espinal (Fields, 2004). A nivel supraespinal, los opioides estimulan los receptores opioides localizados en las interneuronas GABAérgicas en el RVM, de forma que disminuye la liberación de GABA. A nivel espinal, la analgesia inducida por los opioides está mediada por la activación de los receptores opioides  $\mu$  localizados en el asta dorsal de la médula espinal. La activación de estos receptores presinápticos causa la hiperpolarización de la membrana, y estos cambios en el potencial eléctrico de membrana inhiben la liberación de mediadores de las vías del dolor como el glutamato, la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) de terminales de neuronas primarias nociceptivas aferentes. De esta forma se inhibe la transmisión de la sensación dolorosa (Gomes *et al.*, 2004).

### 3.5 Efectos secundarios de la morfina: tolerancia y dependencia

Uno de los principales problemas que presenta el uso clínico de la morfina es la rápida tolerancia y dependencia que produce. Se ha demostrado que la tolerancia analgésica en humanos se produce dentro de los 5 días de un tratamiento, y se relaciona en gran medida con eventos de desensibilización relacionados con la morfina, más que con la internalización del receptor. Esta desensibilización es debida a la pérdida de alguno de los componentes del proceso de regulación de los receptores, como la fosforilación y desfosforilación o la unión de arrestinas, que son procesos más rápidos y no requieren la endocitosis y el reciclaje del receptor (Dang and Christie, 2012). La principal hipótesis que se baraja actualmente es que la  $\beta$ -arrestina 2 ( $\beta$ -arr2) desempeña un papel fundamental en la desensibilización del receptor opioide  $\mu$ . De hecho, Bohn y cols., sostienen que la tolerancia a la morfina está mediada por  $\beta$ -arr2 (Bohn *et al.*, 2000). Por otra parte, la internalización de  $\mu$  es un proceso más complejo que se produce cuando se sobreexpresan ciertas kinasas de GPCR (GRKs), concretamente las GRK2 y GRK3. Esta sobreexpresión provoca un aumento de la fosforilación de Thr370 y Ser375 en el extremo C-terminal del receptor  $\mu$  en respuesta a la morfina, induciendo su internalización (Bohn *et al.*, 2004).

## Introducción

La tolerancia farmacodinámica que provoca la morfina es un proceso altamente complicado que se relaciona con cambios neuroadaptativos, y que incluye la desensibilización de los receptores, el desacoplamiento de las proteínas G, endocitosis, así como alteraciones en las vías de señalización (Mitra and Sinatra, 2004). Cabe destacar que la tolerancia a los efectos depresores respiratorios es incompleta, y se produce más lentamente que la tolerancia a los efectos gratificantes y analgésicos, por lo que la depresión respiratoria grave, así como la asfixia, son las causas más comunes de muerte por sobredosis de morfina (White and Irvine, 1999).

### 3.6 Efectos moleculares tras un consumo agudo de opioides

Como con todas las drogas de abuso, estas pueden administrarse de manera aguda, siendo un consumo puntual, o de forma crónica, con una administración repetida y continuada en el tiempo. Los efectos farmacológicos tras una dosis aguda de morfina están asociados con la estimulación de los receptores opioides, principalmente del receptor opioide  $\mu$  (Figura 7). Tras la unión de un ligando endógeno (endomorfina) o exógeno (morfina) a un receptor opioide, se desencadena la activación de una proteína  $G_o$  o  $G_i$ . El complejo  $\alpha$ -GTP se disocia del dímero formado por las subunidades  $\beta\gamma$ , participando ambos complejos en la transducción de la señal intracelular. La subunidad  $G\alpha_i$ -GTP inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, reduciendo así los niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) en la célula (Chakrabarti *et al.*, 2016), y por tanto bloqueando la activación de la proteína quinasa A (PKA) (Zhang and Pan, 2010). Además, el complejo  $G\alpha_i$ -GTP también activa la fosfolipasa C (PLC) y la vía de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK), siendo muy importante la activación de ERK 1/2 (Macey *et al.*, 2006), que fosforila la proteína CREB (Blendy and Maldonado, 1998). La PLC hidroliza el fosfatidilinosito 4,5-bisfosfato ( $PIP_2$ ) en inositol 1,4,5-trisfosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG): el  $IP_3$  aumenta la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplasmático, que activa la señalización dependiente de calcio. También se observa la activación de los canales de  $K^+$ , lo que conduce a una mayor hiperpolarización de la célula, e indirectamente a una menor excitabilidad celular (Law *et al.*, 2000).

Por otro lado, el dímero  $\beta\gamma$  de las proteínas G bloquea directamente los canales de  $Ca^{2+}$ , disminuyendo la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  (Moises *et al.*, 1994), y produciendo la inhibición de la liberación de otros neurotransmisores. La modulación de la actividad de los canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  tiene lugar en varias áreas del cerebro como el hipocampo y el locus ceruleus (LC), y es uno de los efectos clave de la acción de los receptores opioides sobre la neurotransmisión (Torrecilla *et al.*, 2008; Listos *et al.*, 2019).

La activación de los receptores y su posterior fosforilación por GRKs son procesos esenciales para preparar a los receptores opioides para la unión de la  $\beta$ -arrestina y su posterior internalización. La fosforilación por GRKs bloquea la señalización mediada por las proteínas G, induciendo la desensibilización del receptor opioide (Allouche *et al.*, 2014). Todos estos procesos de señalización aparecen reflejados en la figura 7.

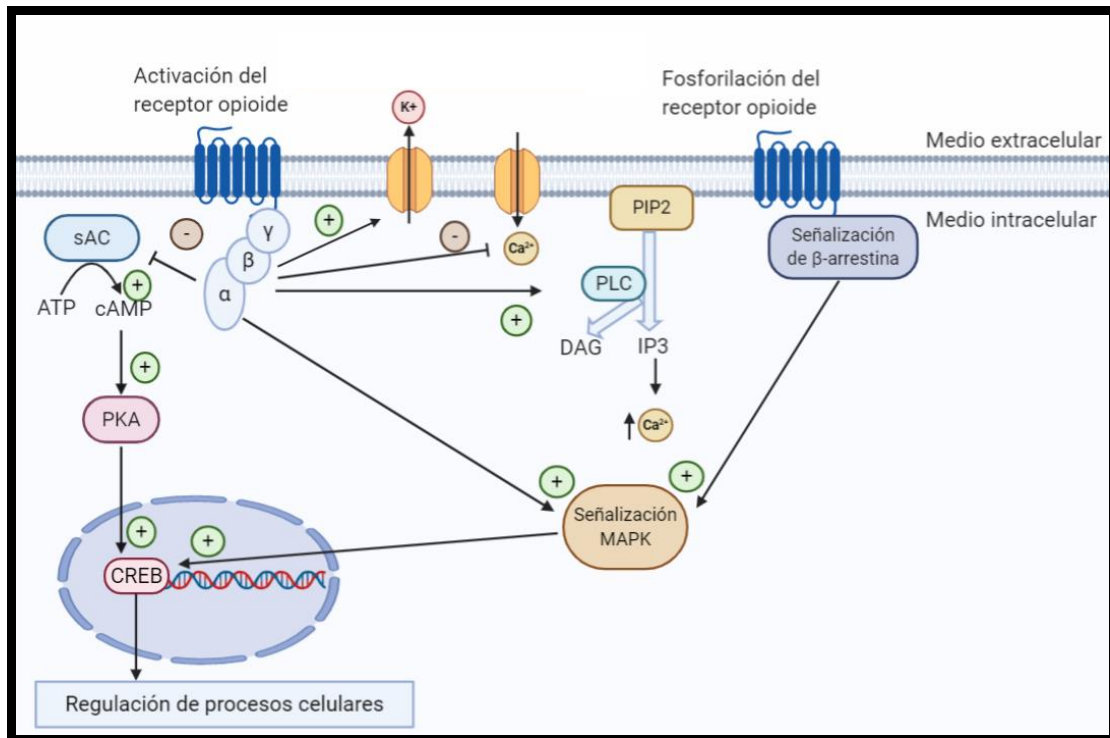


Figura 7. **Transducción de la señal mediada por morfina.** La unión del ligando da lugar a la activación del receptor opioide, que a su vez activa una proteína  $G_o$  o  $G_i$ , formadas por 3 subunidades  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ . El complejo  $\alpha$ -GTP se disocia del dímero  $\beta\gamma$  y ambos complejos contribuyen a la transducción intracelular de la señal. Se produce la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, y por tanto una reducción de los niveles de cAMP que inhiben la PKA. El complejo  $\beta\gamma$  abre los canales de  $K^+$ , produciendo la hiperpolarización de la célula, y bloquea los canales de  $Ca^{2+}$ , reduciendo la concentración de  $Ca^{2+}$  en el interior celular. Por otro lado, la estimulación del receptor opioide  $\mu$  por morfina induce la fosforilación del receptor opioide, que conduce a su desensibilización. Imagen modificada de Listos *et al.*, 2019.

### 3.7 Alteraciones moleculares producidas por el consumo crónico de morfina

Como se ha mencionado anteriormente, el mayor efecto de una dosis aguda de morfina es la disminución de los niveles de cAMP y la hiperpolarización de la membrana plasmática, que es inducida por cambios en la actividad de los canales de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, una estimulación crónica por morfina induce cambios adaptativos y provoca la internalización de los receptores opioides activados y desensibilizados. Este proceso puede estar seguido de una resensibilización del receptor, o bien se produce una regulación por disminución (del inglés *downregulation*), es decir, una degradación proteolítica del receptor (Williams *et al.*, 2013), provocando una disminución de la respuesta tras la unión de un ligando (Listos *et al.*, 2019). La hipótesis que se baraja actualmente es que los mecanismos postraduccionales que se producen tras la activación de estos receptores aparecen muy ligados a la aparición de los fenómenos de tolerancia y dependencia a las drogas de abuso. Es muy posible que estos procesos estén relacionados con los mecanismos de plasticidad neuronal que producen cambios adaptativos en los circuitos neuronales, de forma parecida a los que tienen lugar en los procesos de memoria y aprendizaje (Evans, 2004).

### 3.8 Efectos adictivos de la morfina

Los fármacos opioides como la morfina, la codeína, el fentanilo o la buprenorfina son considerados los analgésicos más efectivos para el tratamiento del dolor postoperatorio o el dolor derivado de procesos cancerosos, pero la administración crónica de estos compuestos está asociada con un elevado potencial adictivo (Listos *et al.*, 2019). Otros opioides como la heroína tienen un uso exclusivamente recreativo que puede conducir a la adicción. En el caso de la morfina, la elevada adicción que presenta se debe fundamentalmente a sus efectos gratificantes o de refuerzo. Estos efectos están mediados principalmente por los receptores opioides  $\mu$  presentes en el VTA, que provocan la liberación de dopamina en el NAc. Otros mecanismos dentro de la vía mesolímbica que modulan los efectos gratificantes de la morfina incluyen los sistemas orexigénicos y cannabinoides (Narita *et al.*, 2006).

Mientras la exposición aguda a morfina activa una serie de mecanismos que producen analgesia, una exposición crónica a morfina produce una desregulación a nivel celular y molecular en el cerebro, dando lugar al fenómeno de la adicción. Se ha demostrado que el consumo crónico de morfina causa dependencia física y adicción psicológica, así como una serie de enfermedades en el SNC como pueden ser trastornos del estado de ánimo, trastorno de conducta, trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) y ansiedad, que conducen a alteraciones de la personalidad, comorbilidad y muerte prematura por sobredosis (Korsgaard *et al.*, 2016; Fridell *et al.*, 2019).

La dependencia física está asociada con la aparición de cambios neuroadaptativos en el SNC que afectan tanto a nivel celular como molecular (Nestler, 2004b; Motahari *et al.*, 2016), siendo estos cambios los responsables de los signos de abstinencia característicos de las drogas de abuso. El grado de severidad de este proceso de abstinencia depende fundamentalmente de varios factores, como el tipo de droga de abuso, la dosis, el tiempo de consumo, la edad del paciente, edad con la que comenzó a consumir, así como ciertas predisposiciones genéticas (Bodnar, 2016). La dependencia física a la morfina se manifiesta por los síntomas abstinencia que se desarrollan después de un cese abrupto de su consumo. Los síntomas más comunes son los estornudos, tos, dolor abdominal, diarrea, anorexia y ansiedad (Listos *et al.*, 2013). Por otro lado, el abuso de morfina también produce dependencia psicológica, que se define como el uso compulsivo de una droga para mejorar la percepción del bienestar. Un síntoma típico de la adicción psicológica en los seres humanos incluye la intensificación del comportamiento de búsqueda de droga, su ingestión compulsiva a pesar de ser consciente de sus efectos nocivos, así como la obsesión persistente y recurrente por dicha droga, incluso después de años de abstinencia.

Actualmente, existen varios tratamientos farmacológicos para tratar la adicción a la morfina. Por un lado, se utiliza la metadona, que es un agonista de acción prolongada del receptor opioide  $\mu$  con elevada eficacia y que alivia los síntomas de abstinencia. Por otro lado, para bloquear los efectos gratificantes de la morfina puede utilizarse la buprenorfina, que es un agonista parcial del receptor opioide  $\mu$  y que puede combinarse con la naloxona (un antagonista no selectivo de los receptores opioides con una afinidad aproximadamente igual para todos ellos). Además, la buprenorfina tiene un “efecto techo” bien tolerado a grandes dosis, lo que la convierte en una alternativa más segura que la metadona (Walsh *et al.*, 1994).

### 3.9 Mecanismos epigenéticos de la tolerancia y dependencia de la morfina

Dado que los factores ambientales pueden influir en la expresión génica, y que determinados genes están relacionados con el riesgo de padecer enfermedades, muchos estudios están centrados en identificar las interacciones entre los genes y el entorno que rodea al proceso de adicción (Agrawal *et al.*, 2012). Actualmente, la investigación en el campo de la epigenética está descubriendo cómo el entorno induce cambios a largo plazo en la expresión de los genes sin alterar la secuencia del DNA (Nestler, 2014). En este sentido, se ha demostrado que una exposición crónica a drogas de abuso puede inducir a complejas interacciones epigenéticas dentro del genoma, regulando así patrones de la expresión génica (Skinner, 2011; Joanna *et al.*, 2017). Estas modificaciones epigenéticas incluyen cambios en la metilación del DNA (Bird, 2002), acetilación y (des)metilación de histonas, que provocan modificaciones en la estructura de la cromatina que alteran el acceso de factores de transcripción al DNA.

La primera evidencia de la importancia de la metilación del DNA en la expresión del receptor  $\mu$  fue publicado en 2007 en ratones P19, donde la hipermetilación del DNA silenciaba el gen del receptor opioide  $\mu$ , mientras que la desmetilación de su promotor inducía una elevada expresión (Hwang *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha demostrado que modificaciones en la cromatina también afectan en la expresión del gen  $\mu$  (Hwang *et al.*, 2010). Mashayekhi y cols., demostraron que alteraciones en los niveles del mRNA del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el VTA y en el LC observadas en ratas tras 7 días de abstinencia a morfina, estaban asociadas con modificaciones en las histonas (Mashayekhi *et al.*, 2012). Otro estudio confirmó el papel de la metilación de histonas en los efectos de la exposición crónica a drogas de abuso, ya que éstas disminuyen la expresión de la histona metiltransferasa G9a (Ehmt2), que cataliza la dimetilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9me2), en el NAc de ratones. La sobreexpresión de la lisina dimetil-transferasa G9a en el NAc suprime los efectos de recompensa de la morfina, mientras que la inhibición de su expresión retrasa el desarrollo de la tolerancia a los analgésicos (Sun *et al.*, 2012). Recientemente se ha confirmado la existencia de cambios epigenéticos en numerosas estructuras cerebrales, como por ejemplo corteza cerebral, cerebelo, hipocampo e hipotálamo, tras una exposición tanto aguda como crónica a los opioides (Barrow *et al.*, 2017).

## 4. La cocaína como droga de abuso

La cocaína es un alcaloide tropano que se obtiene de la hoja de coca (*Erthroxylum coca*, Figura 8A), una planta nativa de las montañas de los Andes y del norte del Amazonas en América del Sur. Coloquialmente la cocaína es conocida como “farlopa” o “nieve”, y es un polvo blanco que normalmente se presenta en forma de clorhidrato y se inhala por la nariz. Por otro lado, el *crack* es la base libre y se presenta como un sólido amarillo que se suele fumar en pipa. A pesar de que existen 8 estereoisómeros de la cocaína, la (R)-(-)-cocaína (Figura 8B) es la especie que genera adicción (Biondich and Joslin, 2015).

## Introducción

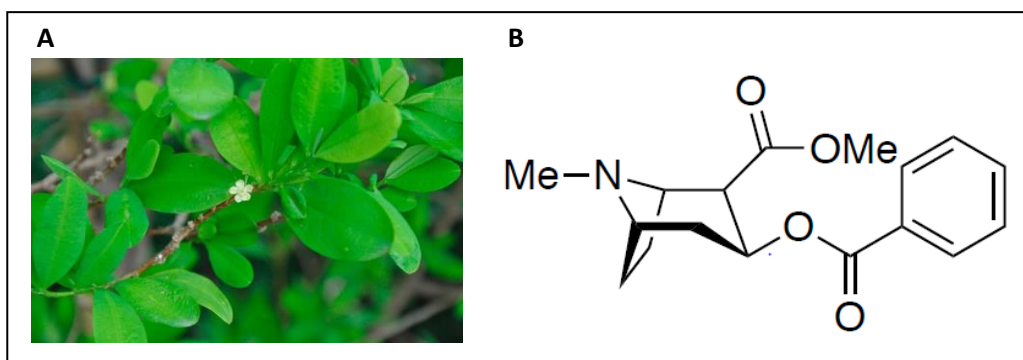


Figura 8. **La cocaína.** **A)** Planta de coca, *Erthroxylon coca*. Imagen tomada de Biondich & Joslin, 2015. **B)** Estructura molecular de la (R)-(-)-cocaína. Imagen tomada de Drake & Scott, 2018.

La cocaína es un potente inhibidor de la recaptación de dopamina, serotonina y noradrenalina que provoca una acumulación de estos neurotransmisores en la hendidura sináptica, potenciando así sus efectos y su acción en la neurona postsináptica. Además, es un psicoestimulante motor que incrementa el estado de alerta. Las acciones farmacológicas de la cocaína se caracterizan por alteraciones de la actividad noradrenérgica y dopaminérgica fundamentalmente.

### 4.1 Aspectos históricos del uso de la cocaína

La historia de la cocaína está salpicada de personajes enigmáticos, incluyendo actores, estrellas de rock, atletas y mafiosos, y está llena de paradojas, riqueza inimaginable e incluso asesinatos. En sus inicios, durante cientos de años, los indígenas de Sudamérica consumían cocaína en forma de té o masticaban las hojas secas de coca con lima dando lugar a la liberación de cocaína en la saliva. Los efectos estimulantes y ese “exceso de felicidad” que esta planta provocaba, además de aliviar el hambre y la sed, hicieron que esta práctica fuera muy común entre la población, llegando a ser considerada como la “planta divina” por los incas. Incluso cuando los españoles invadieron América del Sur (primer tercio del siglo XVI) y esclavizaron a la población indígena, descubrieron que al permitir a los esclavos masticar hojas de coca mientras trabajaban, los hacían más afables y realizaban tareas más peligrosas (Drake and Scott, 2018).

Posteriormente, desde que fue introducida en la sociedad, la cocaína ha servido como fuente de imaginación inspirando la creatividad de artistas y científicos. Las referencias artísticas a la cocaína son abundantes, como por ejemplo el consumo de cocaína por Sherlock Holmes; en las películas de Hollywood (“*Pulp Fiction*”, de Tarantino); en series como “*Narcos*” en 2015-2017 o “*Fariña*” (2018). El mundo de la música también contiene referencias a la cocaína, como la canción “*Crack City*” de David Bowie o “*Cocaine Blues*” de Bob Dylan. En cuanto a personalidades famosas relacionadas con el consumo de cocaína destacan cantantes como Whitney Houston, y actores como Philip Seymour Hoffman o Carrie Fisher, todos ellos fallecidos tras una sobredosis de cocaína o por efectos indirectos del consumo de la misma (Just *et al.*, 2016; Drake and Scott, 2018).

En el ámbito científico, la cocaína se aisló por primera vez por Albert Friedrich Emil Niemann en 1855. Posteriormente, Angelo Mariani desarrolló el *Vin Mariani*, que era un vino Burdeos mezclado con hojas de coca, cuya composición era 10% de alcohol y 8,5% de cocaína



procedente de hojas de coca. Tal fue el éxito de dicho vino que Thomas Edison, así como la reina Victoria del Reino Unido, se declararon *fans* incondicionales del mismo. Sin embargo, el éxito de la cocaína debe ser atribuido a Sigmund Freud, quién documentó por primera vez los efectos eufóricos y estimulantes de dicha droga en su publicación de 1884, *“Una contribución para el conocimiento de los efectos de la cocaína”*, donde también comenta la relación entre los efectos dosis-dependencia de la cocaína en el estado de ánimo y la medida de la percepción (Drake and Scott, 2018).

En torno al siglo XX la cocaína comenzó a comercializarse y a prescribirse contra los dolores de muelas y de cabeza, así como para enfermedades gastrointestinales y neuralgia. Como curiosidad, cabe destacar que la bebida *Coca-Cola* llevaba cocaína en su composición inicial. Hoy en día, esta bebida se obtiene de las hojas de coca con permisos especiales, aunque ya no contenga cocaína (Redman, 2011). A pesar de que ya se conocían las propiedades adictivas de la cocaína, su uso recreativo comenzó a principios del siglo XX y en 1910 aparecen las primeras evidencias científicas del daño nasal de la cocaína tras ser esnifada.

### 4.2 Consumo y producción de cocaína

La cocaína es conocida por su uso recreativo, y ya en la década de los 80 alcanzó las dimensiones de epidemia, con millones de consumidores en el mundo (Cornish, 1996). Se estima que en 2016 hubo más de 18 millones de consumidores de cocaína en todo el mundo, el 32% de ellos norteamericanos y el 20 % consumidores del oeste y del centro de Europa (Kim and Park, 2019). En cuanto a la producción mundial de cocaína, según el Informe Mundial sobre Drogas emitido por la Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), actualmente se encuentra en máximos históricos, con 1.976 toneladas en 2017, un 25% más que el año anterior. En 2017 se registró la cifra récord de 245.000 hectáreas de plantaciones de coca en la región andina. De esa cifra, el 70% estaba en Colombia, el 20% en Perú y el 10% restante en Bolivia, según el informe de la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 2019).

En España, en 2017 el 10% de la población entre 15 y 64 años reconoce haber consumido cocaína en polvo alguna vez en la vida, aumentando en 1,1% respecto a los valores registrados en 2015 (Figura 9). La edad de media de inicio de consumo de esta droga es muy temprana, situándose en 21,1 años, si bien hay casi un año de diferencia entre sexos (20,8 años en hombres y 21,7 años en mujeres). En cuanto a la prevalencia del consumo de cocaína en polvo en los últimos 12 meses, ésta se mantiene alrededor del 2% de la población entre los 15 y 64 años, y la prevalencia del consumo en los últimos 30 días en el 1,1%. Asimismo, desde 2015 hasta 2017 se ha visto incrementado el consumo de esta sustancia psicoactiva tanto entre hombres como entre mujeres, con cifras del 14,3% y 5,7% respectivamente (datos de consumo alguna vez en la vida). Respecto a los datos de policonsumo, la cocaína es la segunda droga ilegal más consumida (4,2%) en la población entre 15-64 años que han consumido analgésicos opioides en los últimos 12 meses (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2019).

En cuanto a la continuidad en el consumo, el 20% de las personas que reconocen haber consumido cocaína alguna vez en la vida, declaran haberla consumido en los últimos 12 meses. Asimismo, el 54,4% de las personas que han consumido cocaína en polvo en el último año declara haber consumido cocaína en polvo en el último mes. Esta proporción aumenta en 9,2

## Introducción

puntos respecto al dato de 2015 (45,2%), siendo la cifra más alta desde 2001. Con respecto al consumo en el último mes, el 1,1% de la población reconoce haber tomado cocaína en polvo en alguna ocasión en los 30 días previos a la realización de la encuesta; tendencia que se mantiene estable desde 2009 (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2019).

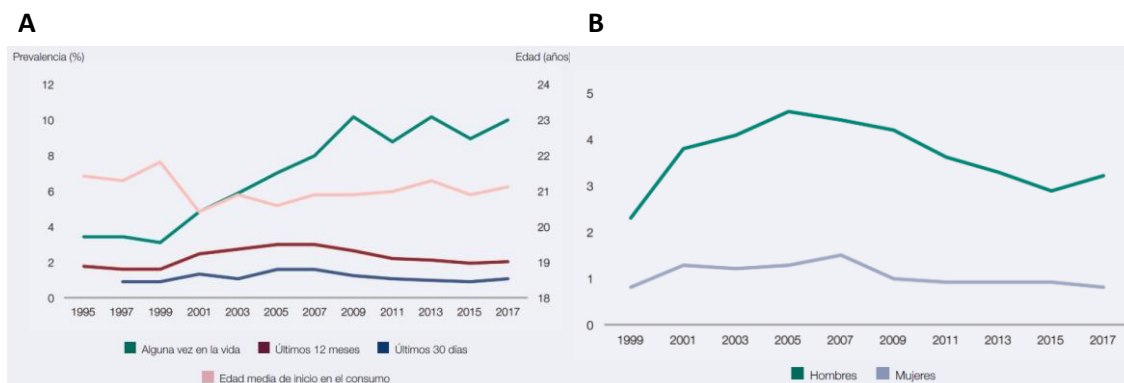


Figura 9. **Evolución de la prevalencia del consumo de cocaína en España. A)** Evolución de la prevalencia de consumo de cocaína en polvo y edad media de inicio en el consumo de cocaína en polvo en la población de 15-64 años (%) en España, 1995-2017. **B)** Evolución de la prevalencia de consumo de cocaína en polvo en los últimos 12 meses en la población de 15-64 años, según sexo (%) en España, 1999-2017. FUENTE: OEDA. Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) (Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2019).

### 4.3 Vías de administración y formas de abuso de la cocaína

#### Vías de administración

La cocaína puede ser administrada por diversas vías, como son:

- Inyección intravenosa: la cocaína se libera directamente al torrente sanguíneo, aumentando la intensidad de sus efectos.
- Fumada: los consumidores inhalan el vapor o el humo en sus pulmones, siendo la absorción de la misma casi tan rápida como por inyección.
- Por inhalación nasal (intranasal, también llamado esnifada): el polvo se absorbe por las fosas nasales.
- Administración oral: la droga se frota por las encías.

#### Formas de abuso

Existen diversos preparados de cocaína, y estas formas de presentación condicionan su farmacocinética, actividad farmacológica, toxicidad y el grado de adicción (Tabla 4). El clorhidrato de cocaína es la sal de la cocaína formada con ácido clorhídrico. Se suele presentar en forma de cristales blancos y su administración es fundamentalmente por vía intranasal o vía venosa. El esnifado de cocaína goza de elevada popularidad porque su absorción y efectos son muy rápidos, debido a la gran vascularización de la mucosa de la nasofaringe. Por otro lado, la administración por vía endovenosa se suele combinar con heroína para evitar el “efecto rebote” producido por la cocaína y caracterizado por cansancio, apatía y angustia, así como una conducta impulsiva y agresiva. Esta vía de administración tiene la ventaja de que los efectos farmacológicos son inmediatos y muy potentes pero de corta duración, con la



posterior aparición frecuente de efectos secundarios como disforia, irritabilidad y alteraciones gastrointestinales.

Con respecto a la cocaína base, ésta se obtiene mezclando clorhidrato de cocaína con una solución básica ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{NaOH}$  o  $\text{NaHCO}_3$ ), se filtra el precipitado o se disuelve con éter. La cocaína base se presenta en dos formas de consumo: 1) mediante la inhalación de los vapores de la base libre extraída del clorhidrato con solventes volátiles (éter) a elevadas temperaturas; 2) como *crack*, que se obtiene añadiendo amoníaco a una solución acuosa de clorhidrato de cocaína en presencia de  $\text{NaHCO}_3$  para alcalinizarla. Tras calentarse, se forma una pasta que se seca y se tritura. Su consumo es mediante inhalación en recipientes calentados o se fuma mezclándolo con tabaco en forma de cigarrillos. El *crack* difunde rápidamente desde los pulmones al cerebro, siendo sus efectos inmediatos (5''), muy intensos (10 veces superiores a la cocaína administrada por vía intravenosa o esnifada) y muy breves (5-10') (Lizasoain *et al.*, 2002).

Tabla 4. **Resumen de las principales presentaciones de la cocaína.** Se detalla la concentración de cocaína, la vía de administración, velocidad de aparición de los efectos, el tiempo de concentración máxima en plasma, la duración de los efectos, así como la aparición de la dependencia (Lizasoain *et al.*, 2002).

Formas de abuso de la cocaína						
Tipo de Sustancia	Concentración de cocaína	Vía de administración	Aparición de efectos	[Máxima en plasma]	Duración de los efectos	Dependencia
Hojas de coca	0,5 – 1,5%	Mascado Infusión oral	Lenta	60'	30-60'	No
Clorhidrato de cocaína	12-75%	Tópica: ocular e intranasal	Rápida	5-10'	30-60'	Sí, a largo plazo
Clorhidrato de cocaína	12-75%	Parenteral: endovenosa o intramuscular	Rápida	30-45''	10-20'	Sí, a corto plazo
Pasta de coca	40-85% (Sulfato de cocaína)	Fumada	Muy rápida	8-10''	5-10'	Sí, a corto plazo
Cocaína base	30-80% (Alcaloide de cocaína)	Inhalada, fumada	Muy rápida	8-10''	5-10'	Sí, a corto plazo

Cabe destacar que no se ha descrito como forma de abuso el consumo de hojas de coca, ya que no es una forma habitual de consumo y actualmente sólo lo realizan algunos integrantes de pequeñas tribus andinas.

#### 4.4 Metabolismo de la cocaína

La cocaína tiene la capacidad de atravesar las membranas celulares de forma rápida, encontrándose en el cerebro apenas 30'' después de haber sido esnifada o introducida por vía intravenosa, e incluso sólo 5'' después de haber sido fumada. La farmacocinética de la cocaína depende de la vía de administración, con un tiempo de concentración máxima en sangre de 1'-

## Introducción

5' para la administración de forma fumada o de inyección intravenosa, y de 60-90' para la administración oral. Los efectos de la cocaína son casi inmediatos, y la duración de su acción farmacológica comprende rangos de 5'-60' tras la administración fumada o intravenosa, y hasta 180' tras la administración oral (Lange and Hillis, 2001). Cuanto más rápido se absorbe, mayor es la intensidad de los efectos pero más corta es su duración. Por ejemplo, tras la inhalación de la cocaína, los efectos comienzan a aparecer de manera lenta unos 15'-30' después del consumo. Por el contrario, el efecto de la cocaína tras ser fumada es inmediato, pero dichos efectos solo duran entre 5' y 10'.

El rango de dosis de cocaína varían entre 0,2 a 3-4 mg/Kg, dependiendo de la vía de administración, así como las concentraciones plasmáticas también varían en función de la vía de administración. Como dato, la dosis letal de cocaína en inyección endovenosa única es de 1g aproximadamente.

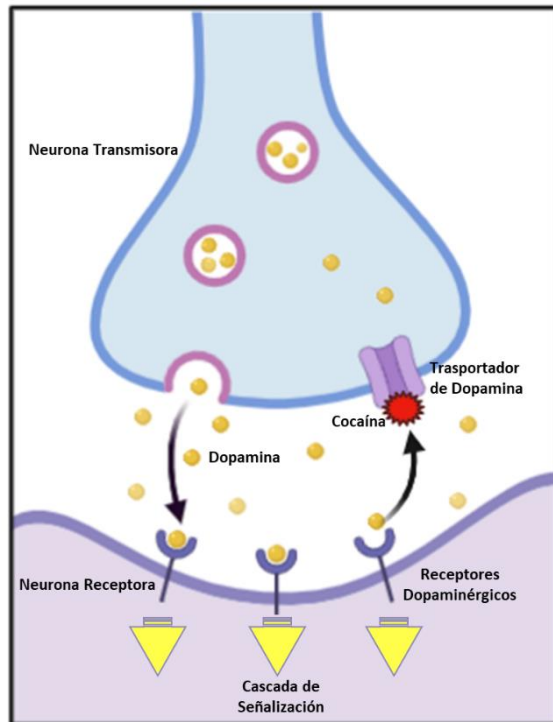
El metabolismo de la cocaína es muy rápido, y generalmente es por hidrólisis enzimática por las colinesterasas del plasma y hepáticas para producir benzoilecgonina (BE) y ecgonina metil ester (EME), que son los metabolitos principales. A partir de ellos se genera otro metabolito como es la ecgonina. Estos metabolitos son solubles en agua, por lo que son excretados en orina y se pueden detectar 24-36h después del consumo de cocaína (Lizasoain *et al.*, 2002). Esta es la razón por la que la detección de BE en orina es un marcador de consumo de cocaína.

### 4.4.1 Efectos fisiológicos a corto plazo del consumo de cocaína

A corto plazo, los efectos fisiológicos que produce la cocaína afectan fundamentalmente al sistema cardiovascular, como la vasoconstricción, arritmias, el aumento de la temperatura corporal, frecuencia cardíaca y presión arterial. Otros efectos que se manifiestan tras un consumo de cocaína es la dilatación de las pupilas, inquietud, ansiedad, pánico o alucinaciones así como temblores y vértigos (Goldstein *et al.*, 2009). Una dosis baja de cocaína en el organismo provoca una sensación de euforia, energía, estado de alerta e hipersensibilidad en la vista y el tacto (Spronk *et al.*, 2013). De hecho, la buena aceptación de la cocaína como droga de uso recreativo se debe a estos efectos relacionados con un incremento en el nivel de alerta. Por otro lado, una dosis alta intensifica los efectos anteriormente mencionados, provocando comportamientos violentos entre los consumidores, así como inquietud, irritabilidad, ansiedad, alteraciones de la realidad, pánico, temblores, vértigos y sacudidas musculares (Goldstein *et al.*, 2009; Riezzo *et al.*, 2012). Además, una dosis elevada de cocaína durante los primeros consumos puede causar la muerte prematura por infarto.

En relación con el Sistema Nervioso, la cocaína actúa sobre el transportador de dopamina (DAT) en el espacio sináptico, bloqueándolo y, por tanto, inhibiendo la recaptación de la misma (Figura 10). A nivel del Sistema Nervioso Simpático, la cocaína inhibe la recaptación de otros neurotransmisores, además de la dopamina, como la norepinefrina y la serotonina ya que interacciona con sus transportadores, dando lugar a una prolongada activación del Sistema Nervioso Simpático (Howell *et al.*, 2007). Además, la cocaína bloquea los canales de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  provocando las arritmias anteriormente mencionadas (Schwartz *et al.*, 2010). Por otro lado, la cocaína también puede actuar como anestésico local debido a su efecto directo sobre las membranas celulares y su capacidad de inhibir la permeabilidad al  $\text{Na}^+$

durante la despolarización, bloqueando de esta forma la transmisión de la señal eléctrica y deteniendo así la señal de dolor (Drake and Scott, 2018).



**Figura 10. Mecanismo de acción de la cocaína.** La cocaína bloquea el transportador de dopamina (DAT) situado en la neurona presináptica, impidiendo así la recaptación y reciclaje de la dopamina. Esto provoca un aumento de los niveles de dopamina en la hendidura sináptica, lo que potencia los efectos postsinápticos de este neurotransmisor.

#### 4.4.2 Efectos fisiológicos a largo plazo del consumo de cocaína

Tras una exposición repetida a cocaína, el cerebro se adapta a los cambios que produce esta droga con el objetivo de que el sistema de recompensa se vuelva menos sensible a los estímulos causantes de ese refuerzo (Mantsch *et al.*, 2014). Los consumidores suelen tomar la cocaína de forma intermitente y ocasional, pero suelen aumentar cada vez más la frecuencia de consumo y aumentar las dosis. Esto provoca una mayor irritabilidad, ataques de pánico e incluso alucinaciones, haciendo que el individuo pierda el contacto con la realidad. Asimismo, el aumento de las dosis conlleva un mayor riesgo de padecer los efectos psicológicos y fisiológicos adversos (Goldstein *et al.*, 2009; Riezzo *et al.*, 2012). Además, estudios en animales sugieren que el consumo de cocaína durante la adolescencia aumenta la susceptibilidad a los efectos gratificantes de la cocaína, incrementando aún más la vulnerabilidad a seguir consumiendo esta droga (Mateos-García *et al.*, 2015).

Por otro lado, a medida que el consumo se va repitiendo, se van intensificando los efectos que aparecen a corto plazo y que pueden desembocar en graves complicaciones médicas. Uno de los principales efectos de la cocaína es la reducción del flujo sanguíneo en el tracto gastrointestinal, pudiendo dar lugar a la pérdida del apetito y pérdida de peso. Además, la cocaína afecta de manera muy tóxica al corazón y al sistema cardiovascular (Riezzo *et al.*, 2012; Fonseca and Ferro, 2013), estando relacionado el consumo de cocaína con un mayor riesgo de accidentes cerebrovasculares (Fonseca and Ferro, 2013), así como con la inflamación del músculo cardíaco, el deterioro de la capacidad de contracción del corazón y las rupturas aórticas (Maraj *et al.*, 2010). Aparte del aumento del riesgo de padecer accidentes cerebrovasculares, el consumo de cocaína puede provocar otra serie de problemas

## Introducción

neurológicos: enfermedades como trastornos del movimiento, incluyendo el Parkinson, pueden producirse tras años de consumo de cocaína (Buttner, 2012; Riezzo *et al.*, 2012). Numerosos estudios sugieren que el uso prolongado de cocaína afecta a una amplia gama de funciones cognitivas, como el mantenimiento de la atención, la memoria y la realización de tareas motrices (Spronk *et al.*, 2013).

Otra de las principales consecuencias del consumo crónico de cocaína es la tolerancia, que implica la necesidad de aumentar la dosis para obtener los mismos efectos placenteros o de recompensa que en el primer consumo (Wolf, 2010). De hecho, esta elevada tolerancia es lo que conduce a la mayoría de las muertes por sobredosis entre los consumidores de cocaína. Además, un consumo crónico de cocaína disminuye el funcionamiento de la corteza orbitofrontal (OFC), lo que parece afectar a la toma de decisiones y ser causa de la incapacidad de adaptarse a las consecuencias negativas del consumo de drogas y de la falta de autoconciencia que muestran las personas adictas a la cocaína (Lucantonio *et al.*, 2012). Todas estas alteraciones aparecen resumidas en la tabla 5.

Tabla 5. **Efectos de la cocaína tras un consumo crónico.** Se resumen los efectos de la cocaína sobre distintos sistemas orgánicos tras un consumo crónico o a largo plazo.

Efectos de la cocaína en el organismo tras un consumo crónico	
Alteraciones neurológicas y del SNC	Irritabilidad, ataques de pánico y alucinaciones. Trastornos del movimiento (tipo parkinsoniano). Alteración de funciones cognitivas como el mantenimiento de la atención, la memoria y la realización de tareas motrices (Goldstein <i>et al.</i> , 2009; Buttner, 2012; Riezzo <i>et al.</i> , 2012; Spronk <i>et al.</i> , 2013).
Aparato digestivo	Reducción del flujo sanguíneo en el tracto gastrointestinal y pérdida de apetito y peso cardiovascular (Riezzo <i>et al.</i> , 2012; Fonseca and Ferro, 2013).
Aparato cardiovascular	Mayor riesgo de accidentes cerebrovasculares, inflamación del músculo cardíaco, deterioro de la capacidad de contracción del corazón y rupturas aórticas (Maraj <i>et al.</i> , 2010; Fonseca and Ferro, 2013).

Recientemente se ha demostrado que el estrés también influye en el consumo de cocaína. Aunque los circuitos cerebrales del estrés son distintos del sistema de recompensa, estudios recientes sugieren que la cocaína eleva las hormonas del estrés, induciendo neuroadaptaciones que aumentan aún más la sensibilidad a la droga, así como la necesidad de volverla a consumir (Mantsch *et al.*, 2014). Por tanto, el estrés puede contribuir a una recaída en el consumo de cocaína.

Por otro lado, cada vía de administración presenta sus propios efectos adversos a largo plazo. Así, la inhalación de cocaína de forma regular puede dar lugar a la pérdida del sentido del olfato, hemorragias nasales, problemas con la deglución o alteraciones relacionadas con el tabique nasal. La cocaína fumada afecta fundamentalmente a los pulmones, provocando taquipnea, respiración irregular y edema agudo de pulmón, entre otros (Goldstein *et al.*, 2009). Por último, los principales riesgos de la vía intravenosa son las enfermedades infecciosas como el VIH o la hepatitis C (González *et al.*, 2015).

#### 4.4.3 Toxicidad y policonsumo de cocaína

Como acabamos de mencionar, uno de los efectos secundarios más importantes del consumo de cocaína es la cardiotoxicidad, que incluso puede provocar la muerte súbita (Kim and Park, 2019). Las principales complicaciones agudas son las arritmias, el infarto agudo de miocardio (IAM) y los accidentes cerebrovasculares (Riezzo *et al.*, 2012). Las principales alteraciones crónicas son la miocardiopatía y la enfermedad de las arterias coronarias (EAC) (Kim and Park, 2019).

Las sobredosis de cocaína son frecuentemente letales, fundamentalmente por la cardiotoxicidad producida por una hiperactividad noradrenérgica y dopaminérgica. La cocaína disminuye el diámetro de las arterias coronarias entre 4-29% en humanos debido a la estimulación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos, por lo que esta actividad vasoconstrictora reduce el riego sanguíneo al corazón. Con el tiempo, la vasoconstricción prolongada puede provocar daños endoteliales a causa de un aumento del esfuerzo de las paredes de los vasos sanguíneos, de forma que, el uso crónico de cocaína aumenta el riesgo de sufrir infartos de miocardio y arritmias (Phillips *et al.*, 2009). De hecho, el infarto agudo de miocardio es la complicación mejor documentada tras un abuso crónico de cocaína (Shields *et al.*, 2015).

En relación con el policonsumo, el etanol es la droga que más se combina con la cocaína, alterando el perfil metabólico de ésta, ya que el etanol disminuye los potentes efectos estimulantes de la cocaína sobre el SNC (Xu and Kang, 2017). El abuso de cocaína y alcohol combinados aumenta significativamente los niveles de cocaína en la sangre, incrementando los riesgos cardiovasculares. Otras combinaciones con la cocaína incluyen estimulantes, sedantes, cannabis y opioides, buscando generalmente contrarrestar los efectos estimulantes de la cocaína (Drake and Scott, 2018).

Por otro lado, la cocaína no solo tiene efectos sobre el sistema cardiovascular tras un episodio de intoxicación aguda, sino que también altera el correcto funcionamiento de otros sistemas como el respiratorio, digestivo, el SNC y el metabolismo basal (Tabla 6).

Tabla 6. **Efectos de la cocaína tras una intoxicación aguda.** Se resumen los efectos de la cocaína sobre distintos sistemas orgánicos. Datos tomados de (Lizasoain *et al.*, 2002).

Efectos en el organismo tras una intoxicación aguda	
Alteraciones neurológicas y del SNC	Cefalea, ictus, hemorragias cerebrales, convulsiones, ansiedad, alucinaciones visuales y táctiles, alteraciones en la percepción.
Aparato cardiovascular	Bradicardia o taquicardia, arritmia, hipertensión e infarto agudo de miocardio.
Aparato respiratorio	Respiración irregular. Patologías relacionadas con los problemas de administración fumada de la cocaína como taquipnea, respiración irregular, edema agudo de pulmón, etc.
Aparato digestivo	Anorexia, náuseas, vómitos, diarreas y úlceras gastrointestinales (menos frecuentes).
Metabolismo	Hipertemia debida al desajuste del control dopaminérgico de la temperatura.

### 4.5 Tratamiento farmacológico

Actualmente no existen fármacos eficaces para el tratamiento de la adicción a la cocaína. Las primeras investigaciones en busca de un tratamiento farmacológico se centraron en la dopamina, pero posteriormente se determinó que la cocaína también afecta a otros neurotransmisores como la serotonina, el GABA, la noradrenalina y el glutamato (Shorter *et al.*, 2015). Existen investigaciones están centradas en el receptor dopaminérgico D3 relacionado con las funciones emocionales y los centros de recompensa (Karila *et al.*, 2011). Otros estudios están centrados en probar compuestos para reestablecer el balance entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria que aparece alterada durante el consumo crónico de cocaína (Kampman, 2010).

También se ha llegado a desarrollar una vacuna cuyo objetivo es la estimulación del sistema inmune para crear anticuerpos específicos frente a la cocaína, evitando que penetre en el cerebro (Kosten and Domingo, 2013). Incluso se ha llevado a cabo un ensayo clínico, en el cual los sujetos vacunados desarrollaron niveles elevados de anticuerpos frente a la cocaína y redujeron su consumo significativamente; sin embargo, los niveles de anticuerpos solo se mantuvieron elevados durante 2 meses (Martell *et al.*, 2009). Actualmente se está intentando optimizar esta vacuna con el objetivo de mejorar la producción de anticuerpos (Cai *et al.*, 2013; Kosten and Domingo, 2013). Otra aproximación es el empleo de la ingeniería genética y utilizar enzimas humanas involucradas en la degradación de la cocaína, lo que contrarrestaría los efectos conductuales y tóxicos de una sobredosis de cocaína (Schindler and Goldberg, 2012).

### 4.6 Mecanismos epigenéticos de la tolerancia y dependencia de la cocaína

Una exposición repetida de cocaína provoca alteraciones a nivel génico en varios núcleos cerebrales, pero fundamentalmente en el sistema límbico y más concretamente en el NAc (Pierce *et al.*, 2018). Las alteraciones de la expresión génica producidas por la cocaína están reguladas por complejas interacciones entre factores de transcripción, cromatina y procesos epigenéticos (Nestler, 2004b; Robison and Nestler, 2011). En cuanto a las modificaciones epigenéticas, el ámbito de la neurociencia está centrado en la acetilación de histonas, que tiende a abrir la cromatina permitiendo la transcripción de genes. En cambio, la metilación de histonas es un proceso más complejo, ya que la inducción o represión de la transcripción depende del residuo donde se produzca la metilación así como del número de grupos metilos añadidos (Renthall *et al.*, 2009).

En un estudio en ratones tratados durante 7 días con cocaína se observó que esta droga provocaba un aumento en la expresión de los genes *arc*, *cart*, *cdk5* *nfkb* y *period 1*, y que dicho aumento estaba asociado con un aumento de los niveles de acetilación de la histona H3 y/o H4, sin cambios en la metilación de la histona H3 (Renthall *et al.*, 2009). Los primeros estudios acerca el efecto de la cocaína sobre la metilación de histonas se centraron en la trimetilación de la Lys<sup>9</sup> en la histona H3 (H3K9me3); en ellos se describe que una exposición repetida a cocaína disminuye los niveles H3K9me3 en el NAc, lo que provoca el “desilenciamiento” (*unsilencing*) de elementos retrotransponibles *LINE-1* (*Long interspersed element-1*). Estas modificaciones pueden ser las responsables de los cambios en la expresión génica en el NAc tras la exposición repetida a cocaína (Maze *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que la existencia de la marca epigenética H3K9me3 en el promotor del gen del receptor de dopamina

D2 disminuye la expresión de este gen en el NAc en modelos de ratas que muestran una búsqueda compulsiva de cocaína (Flagel *et al.*, 2016). Un estudio genómico en el NAc de ratón ha demostrado que la exposición repetida de cocaína produce alteraciones tanto de las modificaciones represoras de las histonas (H3K9me2, H3K9me3 y H3K27me3) como de las activadoras (H3K4me1, H3K4me3 y H3K36me3) en numerosos genes y *loci* no génicos (Feng *et al.*, 2014).

En cuanto a la metilación del DNA, la transcripción génica está influenciada por metilaciones en citosinas que ocurren generalmente en unas regiones denominadas islas CpG, ricas en citosinas y guaninas unidas por fosfatos, que suelen estar concentradas en regiones promotoras próximas al inicio de la transcripción. La metilación de estas islas CpG mediante enzimas como las DNA metiltransferasas (DNMTs), provocan un silenciamiento génico. Por el contrario, si la metilación se produce dentro de la región codificante del gen, se promueve la expresión génica (Vaillancourt *et al.*, 2017). Además, la metilación en islas CpG facilita la unión al DNA de otras proteínas como la proteína MeCP2 (proteína 2 de unión metil-CpG), que se une al DNA metilado, recluta a otras proteínas y provoca la compactación del DNA (Figura 11). Dentro de los genes diana, destacan los factores de transcripción CREB y c-fos (Fasolino and Zhou, 2017). c-Fos está muy relacionado con los procesos comportamentales, cambios epigenéticos y adaptaciones celulares que se producen tras el consumo de cocaína. Wright y cols., en 2015 demostraron que la exposición a cocaína en el NAc está asociada con una reducción de la metilación en las islas CpG en el promotor del gen c-Fos en ratas. Esto indica que las conductas de búsqueda de droga pueden atribuirse a un proceso dependiente de la metilación del DNA, que ocurre en lugares específicos de los genes expresados en el sistema de recompensa (Wright *et al.*, 2015).

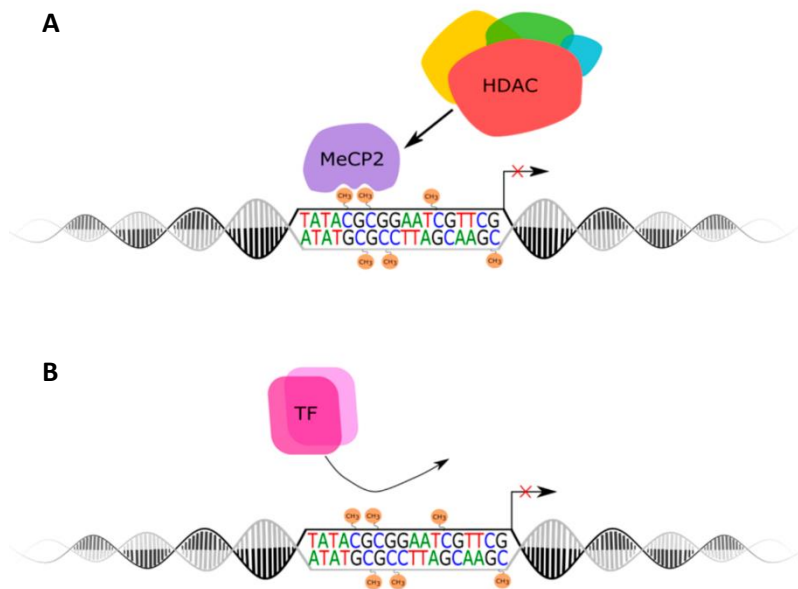


Figura 11. **Metilación del DNA en las islas CpG.** A) La citosinas metiladas dentro del promotor de un gen recluta proteínas de unión al grupo metilo y complejos de remodelación de la cromatina para prevenir la transcripción génica. B) Los promotores génicos metilados evitan la unión del factor de transcripción. Leyenda: MeCP2= Proteína 2 de unión metil-CpG; HDAC=Histona deacetilasa; TF=Factor de transcripción. Imagen tomada de (Vaillancourt *et al.*, 2017).

Con respecto a *Fos*, se trata de una familia de genes formada por *c-fos*, *fra1*, *fra2* y *fosB*, que a su vez codifica para dos proteínas como son FosB y ΔFosB. Esta familia génica está muy relacionada con el desarrollo de dependencia a drogas de abuso. ΔFosB es una forma estable que aumenta las respuestas motoras y de recompensa ante una droga, y además actúa como un interruptor molecular que contribuye a las recaídas (Kelz and Nestler, 2000; Nestler,



## Introducción

2001). Recientemente, se ha relacionado  $\Delta$ FosB con ciertos mecanismos epigenéticos como la metilación de histonas, ya que existe un control por retroalimentación negativa entre FosB y la lisina dimetil-transferasa G9a (*Ehmt2*) (Robison and Nestler, 2011):  $\Delta$ FosB reprime la expresión de esta proteína metiladora de histonas, que a su vez se une al promotor de FosB y lo reprime. Esto se debe a que, tras una exposición aguda a drogas de abuso, aumentan los niveles de G9a, aumentando a su vez su unión con el promotor de *fosB*. En contraposición, tras una administración crónica de cocaína los niveles de expresión de G9a disminuyen, así como la unión de ésta al promotor de *fosB*. Además, se produce la acumulación de  $\Delta$ FosB tras la administración crónica de cocaína (Maze *et al.*, 2010). Por tanto, existe una autorregulación por la cual G9a limita inicialmente la inducción de  $\Delta$ FosB tras una exposición aguda. Sin embargo, a medida que se acumula  $\Delta$ FosB tras una exposición repetida a la droga, se reprime G9a y por lo tanto se potencia su propia inducción (Figura 12).

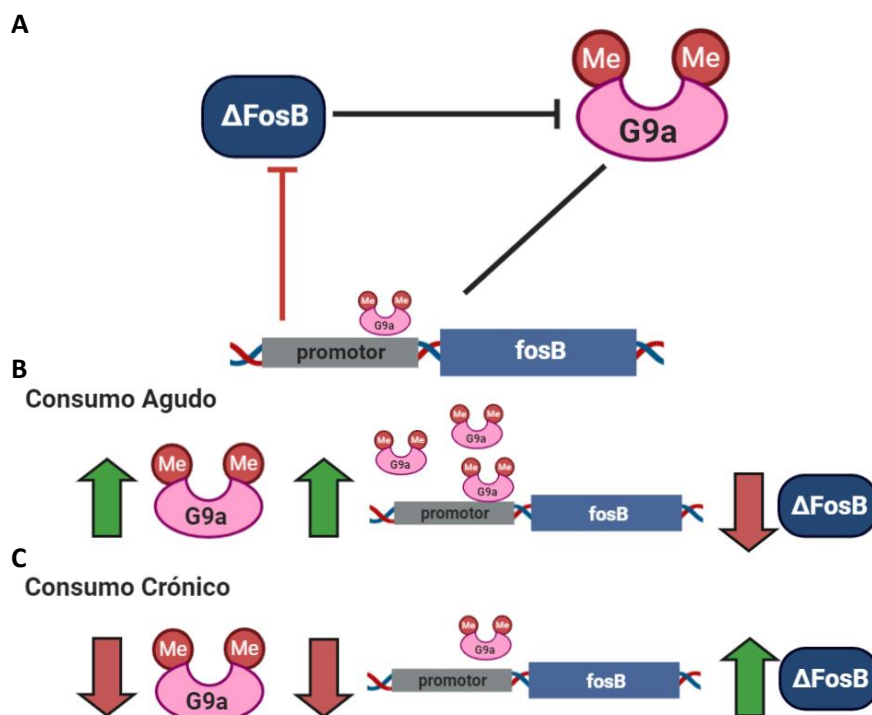


Figura 12. **Regulación de  $\Delta$ FosB a través de la lisina dimetil-transferasa G9a (*Ehmt2*).** **A)**  $\Delta$ FosB reprime la expresión de *ehmt2*, que a su vez se une al promotor de FosB reprimiendo la expresión de esta proteína. **B)** Durante un consumo agudo de cocaína se produce un aumento de *Ehmt2*, que se une al promotor de *fosB*, disminuyendo la expresión de  $\Delta$ FosB. **C)** Por el contrario, durante un consumo crónico de cocaína, los niveles de *Ehmt2* disminuyen, así como la unión al promotor de *fosB* aumentando los niveles de  $\Delta$ FosB. De esta forma existe una autorregulación por la cual *Emht2* limita inicialmente la inducción de  $\Delta$ FosB durante un consumo agudo de cocaína, mientras que en una exposición crónica se reprime la expresión de *emht2* ya que se acumula  $\Delta$ FosB. Imagen realizada por el autor.

Como conclusión, la exposición a cocaína está asociada tanto con procesos de hiper- como de hipometilación del DNA. La estabilidad de una alteración por cambios en la metilación del DNA, así como su potencial transmisión a la descendencia y su asociación con cambios neuroadaptativos (de plasticidad o memoria), es un campo de estudio que está creciendo en los últimos años (Vaillancourt *et al.*, 2017).



## 5. El sistema dopaminérgico de recompensa

El sistema de recompensa es un conjunto de estructuras cerebrales y vías neuronales responsables de la cognición relacionada con la gratificación, el aprendizaje asociativo, la motivación, deseo y ansia de una recompensa, así como con las emociones con valor positivo o placer (Berridge and Kringelbach, 2016). Las estructuras cerebrales más importantes que componen el sistema de recompensa son: el VTA, que presenta proyecciones dopaminérgicas hacia el NAc, además de proyectar al sistema límbico y la corteza prefrontal; el tubérculo olfatorio y las cortezas prefrontal y cingular (Adinoff, 2004; Nestler, 2004a; Yager *et al.*, 2015). Este sistema puede ser activado tanto por estímulos naturales (la comida o el sexo), como por sustancias adictivas como la morfina y la cocaína (Lau *et al.*, 2006), terminando todos ellos en una conducta de refuerzo.

### 5.1 La dopamina: Función y síntesis

La dopamina (DA, 3,4-dihidroxifenetilamina) es el principal neurotransmisor del sistema de recompensa, que es liberado por las neuronas presinápticas de las vías dopaminérgicas tras una estimulación de dicho sistema. Lleva a cabo su función al interaccionar con los receptores dopaminérgicos situados en las neuronas postsinápticas. Comúnmente se conoce a la dopamina como la “*sustancia de la felicidad*”, debido a los efectos placenteros que desencadena (Wenzel *et al.*, 2014). En cuanto a su estructura (Figura 13), la dopamina es una catecolamina de la familia de otros neurotransmisores como la norepinefrina y epinefrina; todos ellos presentan un anillo de benceno con dos grupos hidroxilo laterales y un grupo amina unido a través de una cadena de etilo (Dopamine / C8H11NO2 - PubChem, 2020).

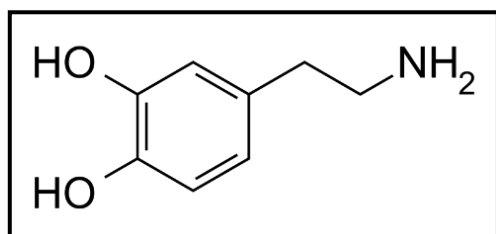


Figura 13. **Estructura molecular de la dopamina.** Imagen modificada de (Dopamine / C8H11NO2 - PubChem, 2020).

La dopamina se sintetiza fundamentalmente en neuronas y en células de la médula adrenal, debido a su función paracrina en otros órganos como riñones, páncreas y sistema inmune (Ayano, 2016). La dopamina es sintetizada a partir de la dihidroxifenilalanina (DOPA), que a su vez puede ser sintetizada indirectamente a partir del aminoácido esencial Phe o directamente a partir del aminoácido no esencial Tyr. Además, la dopamina es el precursor de la biosíntesis de otros neurotransmisores como la epinefrina y norepinefrina (Musacchio, 2013). En esta ruta biosintética, la enzima tirosina hidroxilasa o tirosina 3-monooxigenasa (EC 1.14.16.2) cataliza el paso limitante: la conversión del aminoácido tirosina a DOPA (Figura 14).

## Introducción

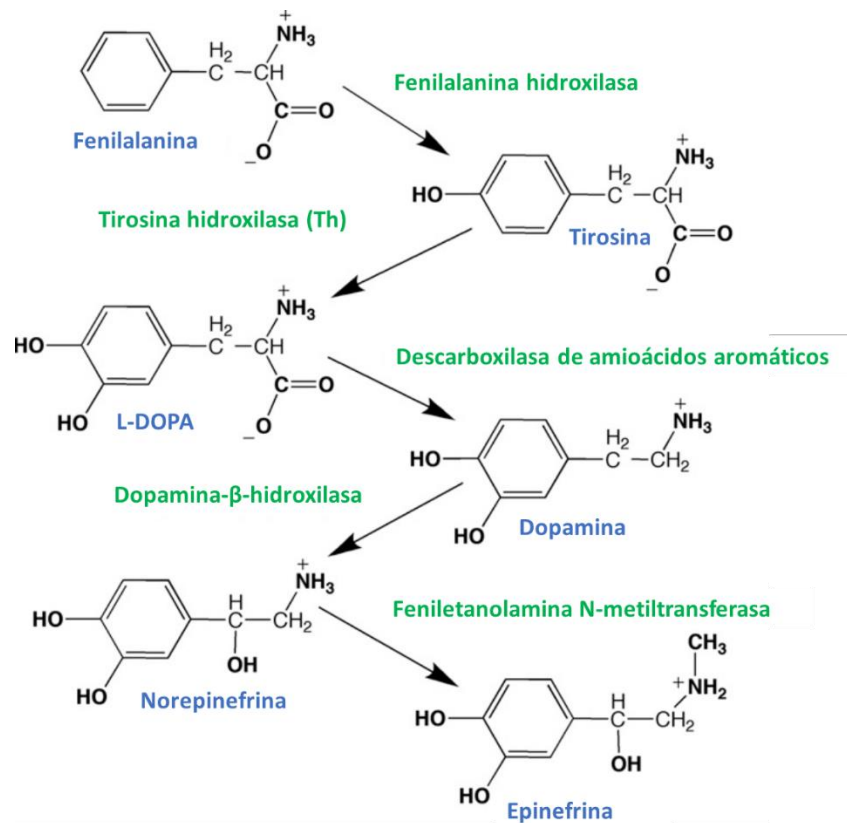


Figura 14. **Ruta de biosíntesis de catecolaminas.** La enzima fenilalanina hidroxilasa convierte la Phe en Tyr, que es hidroxilada a L-DOPA por la Tirosina Hidroxilasa (Th), la enzima limitante de esta vía. La dopamina es sintetizada a partir de la DOPA por una descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. Finalmente, la Dopamina-β-hidroxilasa hidroxila la dopamina a norepinefrina (noradrenalina), la cual es metilada a epinefrina (adrenalina) por una fenilalanina N-metiltransferasa. Imagen modificada de Daubner, Le, & Wang, 2011.

Una vez que es sintetizada, la dopamina se almacena en vesículas hasta que es liberada en la hendidura sináptica mediante exocitosis (Grandy *et al.*, 2016). Allí interacciona con sus receptores desencadenando un potencial de acción en la neurona postsináptica. Posteriormente, la dopamina se separa rápidamente de su receptor y es recaptada de nuevo por la neurona presináptica a través de transportadores específicos para su recaptación (DAT) (Torres *et al.*, 2003; Baik, 2013). Una vez en el citosol, la dopamina puede degradarse o reciclarse en vesículas para volver a ser liberada tras un potencial de acción (Eiden *et al.*, 2004) (Figura 15).

En el cerebro la dopamina participa en importantes funciones como el control motor, la motivación, la gratificación sexual, la excitación, la recompensa y el refuerzo siendo las neuronas y las vías dopaminérgicas moduladores del sistema de recompensa (Torres *et al.*, 2003).

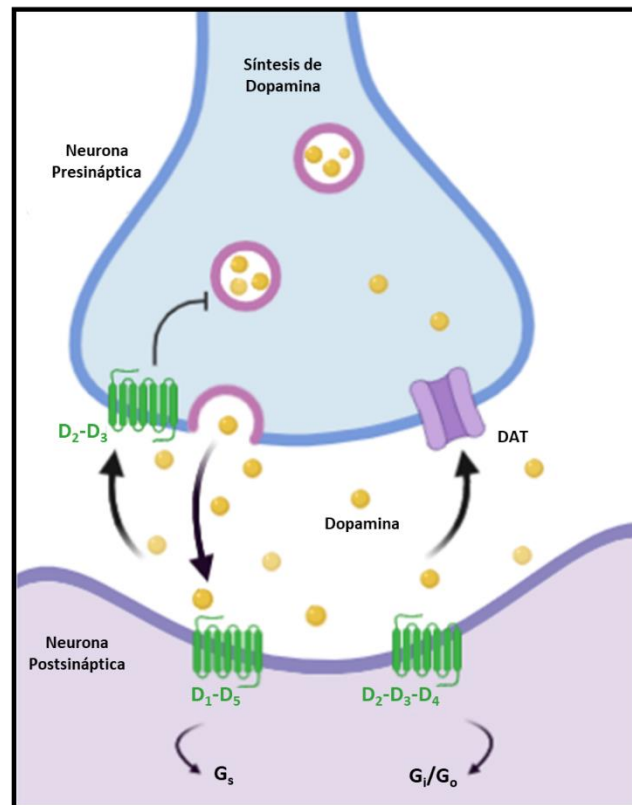


Figura 15. **Mecanismo de acción de la dopamina.** Después de su liberación puede ser absorbida nuevamente por el terminal presináptico o descompuesta por enzimas. Figura realizada por el autor.

## 5.2 Principales vías dopaminérgicas y receptores dopaminérgicos

Existen 4 vías dopaminérgicas principales:

1. La vía mesolímbica fundamental para las funciones del sistema de recompensa.
2. La vía mesocortical necesaria para el aprendizaje y la memoria.
3. La vía nigroestriada que controla los movimientos.
4. La vía tuberoinfundibular que incluye el núcleo arcuato y la región tuberal del hipotálamo.

La señalización dopaminérgica está mediada en el cerebro por dos tipos de receptores metabotrópicos: los receptores tipo D1, que engloba a los receptores D1 y D5; y los receptores tipo D2, que lo constituyen los receptores D2, D3 y D4. Los receptores tipo D1 son los más numerosos en el sistema nervioso y están acoplados a proteínas G<sub>s</sub>, por lo que aumentan los niveles de cAMP al activar la adenilato ciclasa (Rondou *et al.*, 2010). El efecto final de la activación de los receptores tipo D1 puede ser la excitación (a través de la apertura de los canales de Na<sup>+</sup>) o la inhibición (a través de la apertura de los canales de K<sup>+</sup>). Por otro lado, los receptores tipo D2 están acoplados a proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, disminuyen los niveles de cAMP al inhibir la adenilato ciclasa y reducen la entrada de Ca<sup>2+</sup> por los canales dependientes de voltaje. De esta forma, la dopamina puede excitar o inhibir, dependiendo del tipo de receptores y efectores intracelulares que haya en la neurona diana (Beaulieu *et al.*, 2015).

## Introducción

Los receptores dopaminérgicos están implicados en multitud de procesos neurológicos, como el placer, la motivación, la cognición y la memoria, el aprendizaje, así como el procesamiento del dolor. De esta forma, alteraciones en la señalización por estos receptores (o de las vías dopaminérgicas) pueden estar implicadas en enfermedades como esquizofrenia, autismo, adicción, Parkinson, entre otros (Ayano, 2016). Este sistema dopaminérgico es esencial en los procesos de aparición de la adicción, ya que la vía dopaminérgica mesolímbica forma parte del sistema de recompensa (Lau *et al.*, 2006) (Figura 16). Hay estudios que demuestran que tanto los estímulos naturales como las drogas de abuso comparten la misma base neurobiológica y los mismos mecanismos de plasticidad neuronal. Más concretamente, el sistema dopaminérgico mesolímbico está implicado en la activación del sistema de recompensa y en la modulación del comportamiento reproductivo, encontrándose aquí una explicación a las disfunciones sexuales encontradas en heroinómanos (Sharma *et al.*, 2013).

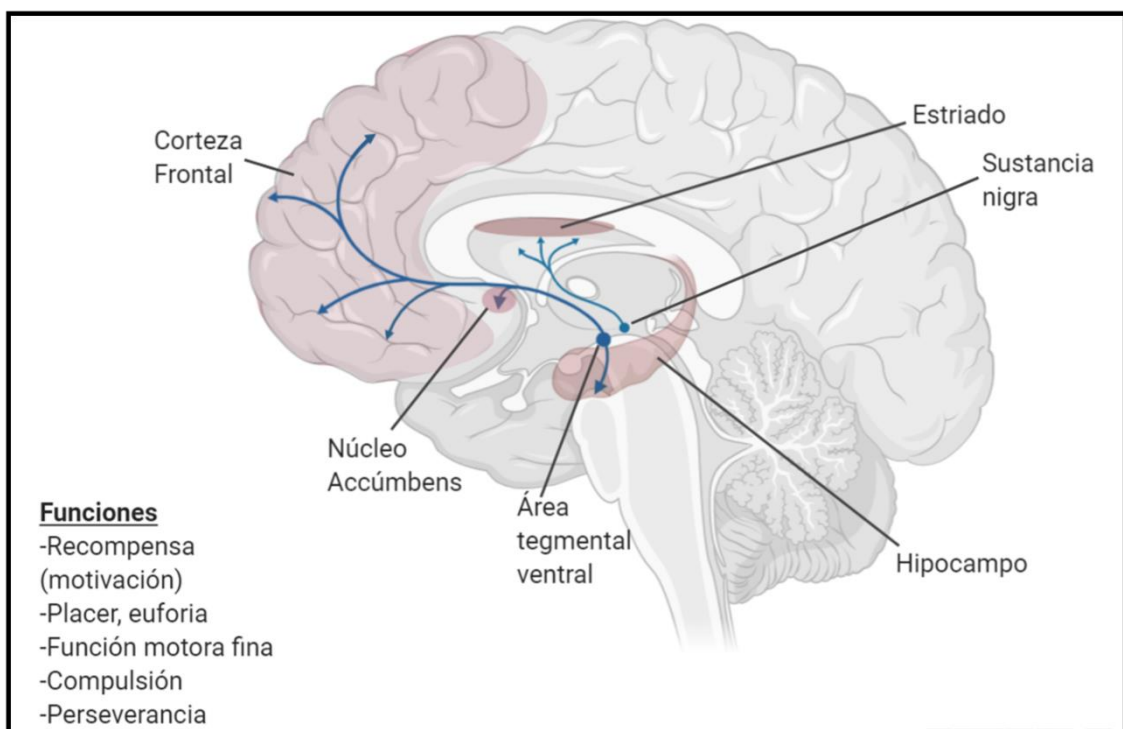


Figura 16. **Sistema de recompensa.** En la imagen aparecen las vías dopaminérgicas implicadas en el sistema de recompensa así como las funciones que regulan. Se puede observar como las proyecciones del sistema de recompensa parten fundamentalmente del VTA y llegan hasta el NAc y la corteza prefrontal (vía mesocorticolímbica). También aparece la vía nigroestriada, que es la vía encargada del control de la motricidad. Imagen realizada por el autor.

### 5.3 El papel del sistema de recompensa en la adicción a las drogas

En etapas tempranas del desarrollo, las diferencias genéticas pueden alterar la expresión de los receptores dopaminérgicos en el cerebro y pueden predecir si una persona desarrollará adicción de una forma más rápida (Volkow and Baler, 2014). Por otro lado, el consumo crónico de drogas desencadena un amplio conjunto de cambios estructurales en el cerebro, que son los responsables de las alteraciones del comportamiento que caracterizan la adicción.

El tratamiento de la adicción a las drogas es muy complicado porque, aunque cese el consumo de la sustancia en cuestión, el deseo o búsqueda (*craving*) de la droga que aparece con la abstinencia psicológica continúa. Incluso cuando el deseo desaparece aparentemente, éste puede resurgir cuando estas personas se enfrentan a estímulos asociados con la droga, como por ejemplo lugares o situaciones, debido a la acción de las áreas de asociación del cerebro. Esto se debe a que la alteración en el sistema dopaminérgico, así como la alteración del control prefrontal y las respuestas estriado-límbicas hiperactivas en respuesta a señales de consumo de droga, estrés o deseo de consumo de drogas, son identificadas como señales neurobiológicas que predicen el deseo y consumo de una droga. Por tanto, estas características clínicas y neurobiológicas del estado de *craving* son consecuencia de alteraciones en los circuitos de autocontrol cortico-límbico-estriado y prefrontal que predicen el ansia por consumo de drogas y riesgo de recaída (Thomas Yeo *et al.*, 2011; Sinha, 2013).

### 5.3.1 Activación del sistema de recompensa por las drogas de abuso

La mayoría de las drogas psicoactivas actúan a nivel del SNC actuando como agonistas o antagonistas de los receptores de mensajeros químicos endógenos (neurotransmisores o neuromoduladores). Por ejemplo, los opioides actúan sobre los receptores de los neurotransmisores opioides endógenos, el cannabis actúa sobre los receptores endógenos de cannabinoides o la cafeína actúa sobre los receptores de adenosina. Otras drogas no actúan directamente sobre los receptores diana de los neurotransmisores, sino sobre otros componentes de la ruta de señalización. Este es el caso de la cocaína, que bloquea la recaptación de dopamina, norepinefrina y serotonina debido a que interacciona con varios transportadores de monoaminas, principalmente con el de dopamina (DAT). De igual forma, las anfetaminas actúan bloqueando el transportador de monoaminas, evitando así la recaptación de estos neurotransmisores (Wise, 1998). En esta tesis doctoral nos centraremos en la morfina y la cocaína.

Normalmente, cualquier sustancia que proporcione placer actúa estimulando el sistema dopaminérgico mesolímbico, de forma que se activa el VTA y se produce la liberación de dopamina en el NAc que, como se ha mencionado anteriormente, es la responsable de los efectos placenteros de las drogas, así como del desarrollo de la adicción. Sin embargo, pueden existir aferencias procedentes de otras estructuras del cerebro como el hipocampo, el córtex prefrontal o la amígdala que también estimulan el sistema mesolímbico (Koob *et al.*, 2004), afectando a los niveles de dopamina en el NAc.

Los efectos de recompensa de la morfina, así como de otros opioides, están relacionados con la activación del receptor  $\mu$  localizados en las neuronas GABAérgicas del VTA. Esta activación de los receptores  $\mu$  inhibe la liberación de GABA, lo que implica la desinhibición de las neuronas dopaminérgicas de VTA y, como consecuencia, se produce una liberación de dopamina en el NAc (Figura 17) (Johnson and North, 1992; Bodnar, 2016). Aunque la dopamina es el neurotransmisor causante de los efectos de recompensa tras una exposición a morfina, existen otros neurotransmisores y neuromoduladores en el SNC como el glutamato, serotonina, GABA, noradrenalina, adenosina y óxido nítrico (Zaniewska and Przeglali, 2015; Listos *et al.*, 2019) que afectan al sistema dopaminérgico, e indirectamente modulan otros aspectos de la adicción a la morfina.

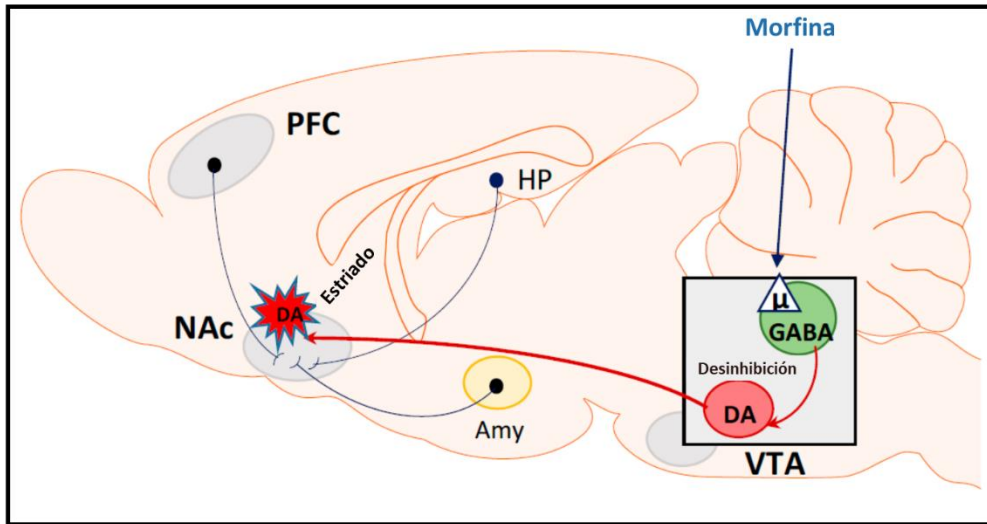


Figura 17. **Efectos en el sistema de recompensa inducidos por morfina.** Los efectos placenteros causados por una exposición a morfina están asociados con una estimulación del receptor opioide  $\mu$  localizado en las neuronas GABAérgicas del VTA. Esto provoca la inhibición de la liberación de GABA y desinhibe las neuronas dopaminérgicas del VTA, que proyectan al NAc. Leyenda: PFC (Córtex Prefrontal), NAc (Núcleo accumbens), HP (Hipotálamo), Amy (Amígdala), VTA (Área Tegmental Ventral), DA (Dopamina). Imagen modificada de Listos *et al.*, 2019.

Por otro lado, tal y como se ha mencionado anteriormente, la cocaína actúa bloqueando el DAT en el espacio sináptico y, por tanto, inhibiendo la recaptación de la misma (Figura 10). Este aumento de los niveles de dopamina en el espacio sináptico produce una mayor activación de sus receptores, potenciando así la señalización postsináptica y produciendo el característico sentimiento de euforia. Esta excesiva estimulación dopaminérgica es la responsable de la mayoría de los efectos de refuerzo de la cocaína y de los efectos sobre la activación motora. A largo plazo, la cocaína provoca la depleción de las reservas de dopamina en la neurona postsináptica, por lo que cada vez se libera menos cantidad de neurotransmisor a la hendidura sináptica. Además, la cocaína bloquea los transportadores de noradrenalina (NET) y serotonina (SERT), si bien con menor afinidad, siendo este bloqueo el responsable de la mayoría de los efectos farmacológicos y de las complicaciones agudas de la cocaína, como la reducción del riesgo sanguíneo al corazón o alteraciones en el ritmo cardíaco.

### 6. Factores de transcripción relacionados con la adicción: CREB y FOS

Un factor de transcripción (TF) es una proteína que se une de manera específica a secuencias concretas de DNA en el promotor de un gen, modulando la expresión génica. Los factores de transcripción activan o reprimen la transcripción por diversos mecanismos como pueden ser: alterando la unión de la RNA polimerasa al promotor (Lee and Young, 2000) o mediante el reclutamiento de proteínas coactivadoras o correpresoras al complejo de transcripción. Además, estos factores de transcripción pueden actuar solos o en conjunto, e incluso unidos a otros complejos proteicos.

Las drogas de abuso, inducen cambios en el NAc en los niveles de la PKA, así como del cAMP, la cuál fosforila varias proteínas entre las que destacan Creb (*cAMP responsive element*

*binding protein*). Creb es un TF que modula la expresión de diferentes genes en el núcleo de las neuronas activadas por drogas (Moratalla, 2008). pCreb es la forma fosforilada y activa de Creb que induce la expresión de genes de expresión temprana o genes inmediatos (IEG, *immediate early genes*). Estos genes son factores de transcripción que se unen al promotor de otros genes denominados genes de respuesta tardía (*late-response genes*), modulando su expresión, ya sea induciéndola o inhibiéndola. Estos últimos son los principales responsables de los cambios moleculares a largo plazo inducidos por drogas de abuso. De esta forma, las drogas de abuso pueden cambiar el patrón de expresión de genes, induciendo cambios y alterando el funcionamiento de neuronas tanto a corto como a largo plazo.

El patrón específico de regulación de los TFs determina qué genes se expresan tras la exposición a una droga. Uno de los principales cambios que se producen en las neuronas tras una administración crónica de drogas de abuso es la acumulación de proteínas de la familia Fos. Esta familia de proteínas se une con proteínas de la familia Jun para formar el heterodímero AP-1 (factor de transcripción activador de proteína-1). Como se ha mencionado con anterioridad, la familia génica Fos está formada por *c-fos*, *fra1*, *fra2*, y *fosB*, que a su vez codifica para dos proteínas como son FosB y ΔFosB. Esta última es una variante de *splicing* truncada que carece del dominio de transactivación C-terminal. Todos los miembros de la familia Fos y Jun son considerados IEGs, ya que son TFs que se inducen rápidamente en muchos tejidos y controlan la expresión de otros efectores finales. Parece que la inducción de *fos* constituye un paso crítico en diversos procesos celulares como el crecimiento y la diferenciación celular, tumorigénesis e incluso la muerte celular (Kelz and Nestler, 2000).

Tanto los opioides como la cocaína inducen en el NAc la expresión de los TFs Creb y Fos (Nestler, 2004a, 2016). Creb también media la hiperexcitabilidad de las neuronas del LC y los comportamientos de abstinencia física (Han *et al.*, 2006). Se ha demostrado que estos cambios en el NAc están relacionados con la dependencia y la tolerancia, y conducen a un aumento del consumo de estas sustancias (Nestler, 2016). En esta tesis doctoral nos vamos a centrar en analizar los efectos de la morfina y cocaína sobre la expresión de Creb y proteínas de la familia Fos.

### 6.1 Efecto de la Morfina sobre los TFs

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, una vez que la morfina interacciona con los receptores opioides, se activan una serie de rutas intracelulares de señalización que pueden activar las cascadas de fosforilación mediadas por la PKA, PKC, MAP kinasas y Akt kinasas (Waldhoer *et al.*, 2004; Corbett *et al.*, 2006). Dentro de las MAP kinasas, cabe destacar la activación de ERK 1/2 (Macey *et al.*, 2006), que fosforila Creb (Blendy and Maldonado, 1998). Se piensa que la tolerancia podría estar causada por la inducción de la adenilato ciclasa, por lo que se incrementarían los niveles de cAMP basales y por tanto, la actividad del factor de transcripción Creb se vería afectada (Nestler, 2016). Con respecto a la familia Fos, la morfina aumenta los niveles de la forma estable ΔFosB, que media las respuestas motoras y de recompensa ante una droga y además actúa como un interruptor molecular que contribuye a las recaídas (Kelz and Nestler, 2000; Nestler, 2001).



## Introducción

### 6.2 Efecto de la Cocaína sobre los TFs

La cocaína provoca cambios a corto y a largo plazo en el SNC, los cuales están implicados en los procesos de adicción que causa esta droga. La cocaína estimula indirectamente los receptores dopaminérgicos, por lo que se activa la vía dependiente de adenosín cAMP y la PKA. Se ha demostrado que la administración aguda de cocaína induce la expresión estriatal de varios factores de transcripción como son *c-Fos*, *FosB*, *Jun B*, *NGFI-A*, entre otros (Moratalla, 2008). La fosforilación de *Creb* inducida por cocaína produce un rápido aumento dosis-dependiente de la expresión de varios genes como son los anteriormente mencionados además de *NGFI-B*, *NF-kB*, *Akt* y *Cdk5* (Nestler, 2004a).

La administración crónica de cocaína no genera un patrón homogéneo de expresión como ocurre en el consumo agudo, sino que induce de forma selectiva la expresión del  $\Delta$ FosB en las neuronas del NAc, acumulándose y permaneciendo elevado durante mucho tiempo debido a la alta estabilidad de esta proteína. Se piensa que  $\Delta$ FosB es responsable de la mayoría de los cambios más permanentes en la expresión génica implicados en la adicción. De hecho, la expresión prolongada de  $\Delta$ FosB en el NAc aumenta los efectos gratificantes de la cocaína y los ratones que sobreexpresan  $\Delta$ FosB en esta región muestran un aumento del condicionamiento del lugar, de la conducta de autoadministración y de las propiedades motivacionales de la cocaína (McClung and Nestler, 2003). Por otro lado, la administración crónica de cocaína también induce la expresión de  $\Delta$ FosB en la corteza orbitofrontal, aumenta el número de espinas dendríticas en las neuronas del NAc y produce acetilación de las histonas en la cromatina de las neuronas de este núcleo (Renthal *et al.*, 2007). Por tanto, la expresión prolongada de  $\Delta$ FosB en el NAc aumenta los efectos reforzadores de la cocaína.

Tanto con el consumo agudo como crónico de cocaína se induce la expresión estriatal de TFs. El patrón específico de expresión de estos TFs es el que determina las cascadas de expresión génica que se activan después de una exposición a la droga. Tras la fosforilación de *Creb* se produce el aumento de la expresión de los genes mencionados con anterioridad (*c-Fos*, *FosB*, *JunB*, *NGFI-A*, *NGFI-B*, *NF-kB*, *Akt* y *Cdk5*) en el núcleo de las neuronas activadas por la cocaína, localizadas en la corteza y en el núcleo estriado dorsal, ventral o en el NAc. Además, existen otras áreas como el hipocampo, la sustancia negra y el VTA donde la activación es menor. Las proteínas de estos genes inducidos tienen una vida media de 2-4h, excepto de *FosB* cuya vida media es superior a las 24-30h.

Se sabe que la expresión de estos genes se correlaciona con los efectos conductuales producidos por la cocaína, ya que el bloqueo farmacológico o molecular de su expresión inhibe la manifestación de la respuesta conductual inducida por cocaína, como por ejemplo la actividad motora o la estereotipia (Drago *et al.*, 1996; Moratalla *et al.*, 1996).

## 7. Pez cebra como animal de experimentación para el estudio de las drogas de abuso

El pez cebra (*Danio rerio*) es el modelo animal empleado en este trabajo de investigación (Figura 18), entre otros motivos, debido al elevado grado de conservación en los circuitos neuronales que presenta, y al hecho de que su sistema dopaminérgico ha sido ampliamente estudiado. Se conoce con exactitud la anatomía del pez cebra, así como su morfología y su genética (Ryu *et al.*, 2006; Mahler *et al.*, 2010; Schweitzer *et al.*, 2012; Parker *et al.*, 2013).



Dentro de las ventajas que presenta este animal para su empleo en el laboratorio, destacan su bajo coste de mantenimiento, el elevado número de descendientes por puesta y el rápido desarrollo externo de embriones transparentes. El pez cebra es uno de los pocos vertebrados que permite realizar observaciones a tiempo real con una resolución subcelular, pudiéndose utilizar en el estudio de diversos sistemas de neurotransmisores, así como su implicación en el desarrollo embrionario. Asimismo, existen estudios acerca del efecto de las drogas de abuso en este animal, como es el alcohol (Mathur and Guo, 2010), la cocaína (López-Patiño *et al.*, 2008) y los opioides (Demin *et al.*, 2018; Bao *et al.*, 2019), así como de la genética de la adicción (Klee *et al.*, 2012). Además, este modelo animal presenta la ventaja de asimilar fácilmente las moléculas disueltas en el medio, lo que lo convierte en un modelo idóneo para analizar los efectos de la morfina y la cocaína (Fishman, 2001).

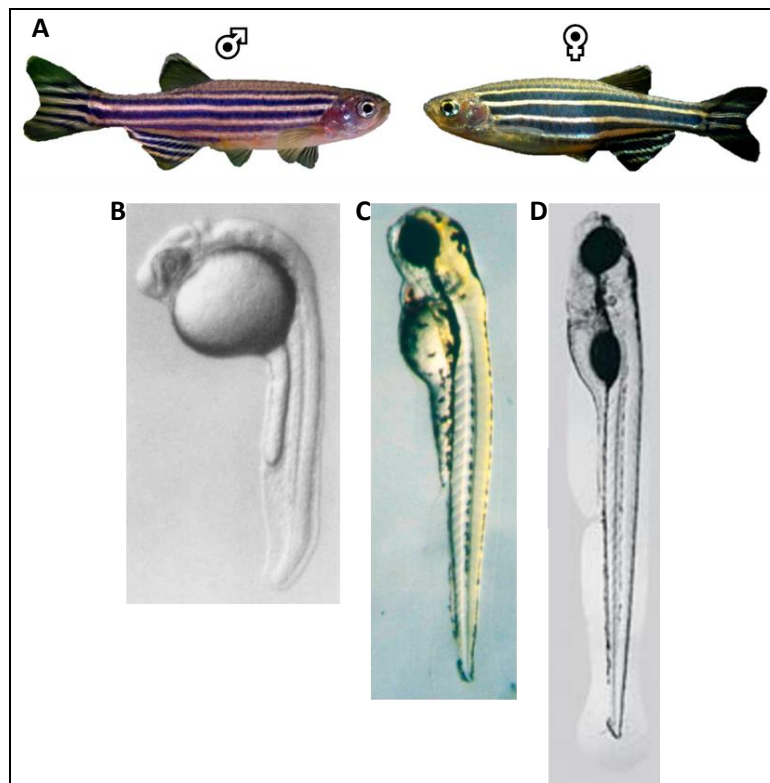


Figura 18. Ejemplares de pez cebra adulto (*Danio rerio*) y embriones de diferentes estadios. **A)** Imagen de un ejemplar de pez cebra macho (izquierda) y hembra (derecha). **B)** Embrión de 24 hpf. **C)** Embrión de 72 hpf. **D)** Embrión de 5 dpf. Imágenes tomadas de (Kimmel *et al.*, 1995; Rojas-Muñoz *et al.*, 2007).

### 7.1 Resultados previos y experiencia del grupo de investigación

El grupo de investigación donde se ha realizado esta tesis doctoral tiene una amplia y destacada carrera profesional en el estudio del sistema opioide, el dolor, la adicción y el sistema de recompensa en el pez cebra. Bajo la dirección de la Dra. Raquel Rodríguez, la directora de esta tesis caracterizó bioquímica y farmacológicamente los péptidos opioides del pez cebra (Gonzalez-Nunez *et al.*, 2003a; Gonzalez-Nunez *et al.*, 2007; Gonzalez-Nunez *et al.*,

## Introducción

2003b; Gonzalez Nuñez *et al.*, 2003c), y colaboró en la caracterización de los receptores opioides (Alvar Alvarez *et al.*, 2006; Pinal-Seoane *et al.*, 2006; Rivas-Boyer *et al.*, 2011). Además, ha analizado la funcionalidad del sistema opioide en el pez cebra (González-Núñez *et al.*, 2005; Gonzalez-Nunez *et al.*, 2006; Gonzalez-Nuñez *et al.*, 2007). Todos estos estudios han establecido que el pez cebra presenta un sistema opioide con un perfil molecular, farmacológico y bioquímico muy similar al de los mamíferos. Por tanto, es un buen organismo para analizar los mecanismos que rigen la acción de los agentes opioides (Gonzalez-Nunez & Rodríguez, 2009) y de otras drogas de abuso.

Esta tesis supone un paso adelante en el estudio y comprensión del efecto de las drogas de abuso, morfina y cocaína, sobre el sistema de recompensa no solamente desde un punto de vista molecular, sino también transcriptómico y proteómico.

## BIBLIOGRAFIA



- Adinoff, B., 2004. Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harv. Rev. Psychiatry* 12, 305–320.
- Agrawal, A., Verweij, K.J.H., Gillespie, N.A., Heath, A.C., Lessov-Schlaggar, C.N., Martin, N.G., Nelson, E.C., Slutske, W.S., Whitfield, J.B., Lynskey, M.T., 2012. The genetics of addiction: a translational perspective. *Transl. Psychiatry* 2.
- Allouche, S., Noble, F., Marie, N., Mollereau, C., 2014. Opioid receptor desensitization: Mechanisms and its link to tolerance. *Front. Pharmacol.* 5, 280.
- Alvar Alvarez, F., Rodriguez-Martin, I., Gonzalez-Nuñez, V., de Velasco, E.M.F., Gonzalez Sarmiento, R., Rodríguez, R.E., 2006. New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci. Lett.* 405, 94–99.
- American Society of Addiction Medicine, 2019. Definition of Addiction. *Am. Soc. Addict. Med.* 117–124.
- Andrews, S., 2010. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [WWW Document]. URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed 3.6.20).
- Angst, M.S., Bührer, M., Lötsch, J., 2000. Insidious Intoxication After Morphine Treatment in Renal Failure : Delayed Onset of Morphine-6-glucuronide Action 1473–1476.
- Anier, K., Malinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A., Kalda, A., 2010. DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology* 35, 2450–2461.
- Aoki, K., Takimoto, M., Ota, H., Yoshida, T., 2000. Participation of CYP2A in cocaine-induced hepatotoxicity in female mice. *Pharmacol. Toxicol.* 87, 26–32.
- Association., A.P., 2013. Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5), Editorial Medica panamericana.
- Ayano, G., 2016. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *J. Ment. Disord. Treat.* 2, 2–5.
- Baik, J.H., 2013. Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Front. Neural Circuits* 7, 1–16.
- Bao, W., Volgin, A.D., Alpyshov, E.T., Friend, A.J., Strekalova, T. V., de Abreu, M.S., Collins, C., Amstislavskaya, T.G., Demin, K.A., Kalueff, A. V., 2019. Opioid Neurobiology, Neurogenetics and Neuropharmacology in Zebrafish. *Neuroscience* 404, 218–232.
- Barrow, T.M., Byun, H.M., Li, X., Smart, C., Wang, Y.X., Zhang, Y., Baccarelli, A.A., Guo, L., 2017. The effect of morphine upon DNA methylation in ten regions of the rat brain. *Epigenetics* 12, 1038–1047.
- Beaulieu, J.M., Espinoza, S., Gainetdinov, R.R., 2015. Dopamine receptors - IUPHAR review 13. *Br. J. Pharmacol.* 172, 1–23.
- Becker, J.B., Chertoff, E., 2019. Sex differences in neural mechanisms mediating reward and addiction. *Neuropsychopharmacology* 584, 54–59.
- Befort, K., Filliol, D., Darcq, E., Ghate, A., Matifas, A., Lardenois, A., Muller, J., Thibault, C., Dembele, D., Poch, O., Kieffer, B., 2008. Gene expression is altered in the lateral hypothalamus upon activation of the mu opioid receptor. *Ann N Y Acad Sci* 1129, 175–184.
- Beitner-Johnson, D., Guitart, X., Nestler, E.J., 1991. Dopaminergic brain reward regions of Lewis and Fischer rats display different levels of tyrosine hydroxylase and other morphine- and cocaine-regulated phosphoproteins. *Brain Res.* 561, 147–150.
- Beitner-Johnson, D., Guitart, X., Nestler, E. j., 1992. Common Intracellular Actions of Chronic Morphine and Cocaine in Dopaminergic Brain Reward Regions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 654, 70–87.

## Bibliografía

- Benzekri, H., Armesto, P., Cousin, X., Rovira, M., Crespo, D., Merlo, M.A., Mazurais, D., Bautista, R., Guerrero-fernández, D., Fernandez-pozo, N., Ponce, M., Infante, C., Zambonino, J.L., Nidelet, S., Gut, M., Rebordinos, L., Planas, J. V, Bégout, M., Claros, M.G., Manchado, M., 2014. De novo assembly , characterization and functional annotation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and common sole (*Solea solea*) transcriptomes : integration in a database and design of a microarray. *BMC Genomics* 15, 952.
- Berridge, K.C., Kringelbach, M.L., 2016. Pleasure Systems of the Brain. *Neuron* 86, 646–664.
- Biondich, A.S., Joslin, J.D., 2015. Coca: High altitude remedy of the ancient incas. *Wilderness Environ. Med.* 26, 567–571.
- Bird, A., 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Birke, A., Scholz, S., 2019. Zebrafish embryo and acute fish toxicity test show similar sensitivity for narcotic compounds. *ALTEX* 36, 131–135.
- Blendy, J.A., Maldonado, R., 1998. Genetic analysis of drug addiction : the role of cAMP response element binding protein. *J. Mol. Med.* 76, 104–110.
- Bodnar, R.J., 2016. Endogenous opiates and behavior: 2014. *Peptides* 124, 18–70.
- Bodzon-Kulakowska, A., Antolak, A., Drabik, A., Marszalek-Grabska, M., Kotlińska, J., Suder, P., 2017. Brain lipidomic changes after morphine, cocaine and amphetamine administration — DESI — MS imaging study. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1862, 686–691.
- Bodzon-Kulakowska, A., Kulakowski, K., Drabik, A., Moszczynski, A., Silberring, J., Suder, P., 2011. Morphinome - A meta-analysis applied to proteomics studies in morphine dependence. *Proteomics* 11, 5–21.
- Bohn, L.M., Dykstra, L.A., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Barak, L.S., 2004. Relative Opioid Efficacy Is Determined by the Complements of the G Protein-Coupled Receptor Desensitization Machinery. *Mol. Pharmacol.* 66, 106–112.
- Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R., Lin, F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2000. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408, 14–17.
- Bourasset, F., Cisternino, S., Tamsamani, J., Scherrmann, J.M., 2003. Evidence for an active transport of morphine-6-β-D-glucuronide but not P-glycoprotein-mediated at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 86, 1564–1567.
- Braunbeck, T., Kais, B., Lammer, E., Otte, J., Schneider, K., Stengel, D., 2015. The fish embryo test ( FET ): origin , applications , and future. *Env. Sci Pollut Res Int.* 22, 16247–61.
- Broos, S., Soete, A., Hooghe, B., Moran, R., van Roy, F., De Bleser, P., 2013. PhysBinder: Improving the prediction of transcription factor binding sites by flexible inclusion of biophysical properties. *Nucleic Acids Res.* 41, 531–534.
- Bryant, H.U., Kuta, C.C., Story, J.A., Yim, G.K.W., 1988. Stress- and morphine-induced elevations of plasma and tissue cholesterol in mice: Reversal by naltrexone. *Biochem. Pharmacol.* 37, 3777–3780.
- Buttner, A., 2012. Neuropathological Alterations in Cocaine Abuse. *Curr. Med. Chem.* 19, 5597–5600.
- Cai, X., Tsuchikama, K., Janda, K.D., 2013. Modulating Cocaine Vaccine Potency through Hapten Fluorination. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 2971–2974.
- Camilo, C., Maschietto, M., Vieira, H.C., Tahira, A.C., Gouveia, G.R., Dos Santos, A.C.F., Negrão, A.B., Ribeiro, M., Laranjeira, R., Vallada, H., Brentani, H., 2019. Genome-wide DNA methylation profile in the peripheral blood of cocaine and crack dependents. *Brazilian J. Psychiatry* 41, 485–493.
- Chahkandi, M., Askari, N., Asadikaram, G., 2015. The Effect of Acute and Chronic Morphine on Some Blood Biochemical Parameters in an Inflammatory Condition in Gonadectomized Male Rats. *Addict. Heal.* 7, 130–9.

- Chakrabarti, S., Chang, A., Liu, N., Gintzler, A.R., 2016. HHS Public Access. *J. Neurochem.* 139, 737–747.
- Christrup, L.L., 1997. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 41, 116–122.
- Corbett, A.D., Henderson, G., McKnight, A.T., Paterson, S.J., 2006. 75 Years of opioid research: The exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br. J. Pharmacol.* 147, 153–162.
- Cornish, J.W., 1996. Crack Cocaine Abuse: An Epidemic with Many Public Health Consequences. *Annu. Rev. Public Health* 17, 259–273.
- Cotto, B., Natarajaseenivasan, K., Ferrero, K., Wesley, L., Sayre, M., Langford, D., 2018. Cocaine and HIV-1 Tat disrupt cholesterol homeostasis in astrocytes: Implications for HIV-associated neurocognitive disorders in cocaine user patients. *Glia* 66, 889–902.
- Cruz, S.L., Granados-soto, V., 2016. *Opioids and Opiates : Pharmacology , Abuse , and Addiction.* Springer New York.
- Dang, V.C., Christie, M.J., 2012. Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *Br. J. Pharmacol* 165, 1704–1716.
- Daubner, S Colette, Le, T., Wang, S., 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 1–12.
- Daubner, S. Colette, Le, T., Wang, S., 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 1–12.
- Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, 2019. INFORME 2019 Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España (EDADES).
- Demin, K.A., Meshalkina, D.A., Kysil, E. V., Antonova, K.A., Volgin, A.D., Yakovlev, O.A., Alekseeva, P.A., Firuleva, M.M., Lakstygai, A.M., de Abreu, M.S., Barcellos, L.J.G., Bao, W., Friend, A.J., Amstislavskaya, T.G., Rosemberg, D.B., Musienko, P.E., Song, C., Kalueff, A. V., 2018. Zebrafish models relevant to studying central opioid and endocannabinoid systems. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 86, 301–312.
- Devereaux, A.L., Mercer, S.L., Cunningham, C.W., 2018. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Morphine. *ACS Chem. Neurosci.* 9, 2395–2407.
- Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE, 2019. adicción | Definición | Dicc. la Leng. española | RAE. [WWW Document]. URL: <https://dle.rae.es/adicción?m=form> (accessed 3.28.20).
- Dickson, P.W., Briggs, G.D., 2013. Tyrosine hydroxylase. Regulation by feedback inhibition and phosphorylation., 1st ed, *Advances in Pharmacology.* Elsevier Inc.
- Dopamine | C8H11NO2 - PubChem [WWW Document], 2020. [WWW Document]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dopamine> (accessed 4.24.20).
- Drago, J., Gerfen, C.R., Westphal, H., Steiner, H., 1996. D1 dopamine receptor-deficient mouse: Cocaine-induced regulation of immediate-early gene and substance P expression in the striatum. *Neuroscience* 74, 813–823.
- Drake, L.R., Scott, P.J.H., 2018. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Cocaine. *ACS Chem. Neurosci.* 9, 2358–2372.
- Dunkley, P.R., Bobrovskaya, L., Graham, M.E., Von Nagy-Felsobuki, E.I., Dickson, P.W., 2004. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: Regulation and consequences. *J. Neurochem.* 91, 1025–1043.
- Dunkley, P.R., Dickson, P.W., 2019. Methods used to investigate TH phosphorylation in vivo. *J. Neurochem.* 149, 706–728.
- Ederoth, P., Tunblad, K., Bouw, R., Lundberg, C.J.F., Ungerstedt, U., Nordström, C., Hammarlund-udenaes, M., 2004. Blood – brain barrier transport of morphine in patients with severe brain trauma. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 57, 427–435.

## Bibliografía

- Editors of Encyclopaedia Britannica. Article Title: Prickly poppy. Website Name: Encyclopædia Britannica. Publisher: Encyclopædia Britannica, inc. Date Published: December 12, 2017. [WWW Document]. URL: <https://www.britannica.com/plant/prickly-poppy> (accessed 4.22.20)
- Eiden, L.E., Schäfer, M.K.H., Weihe, E., Schütz, B., 2004. The vesicular amine transporter family (SLC18): Amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 636–640.
- Ersche, K.D., Stochl, J., Woodward, J.M., Fletcher, P.C., 2013. The skinny on cocaine: Insights into eating behavior and body weight in cocaine-dependent men. *Appetite* 71, 75–80.
- Escobar, M., Scherer, J.N., Soares, C.M., Guimarães, L.S.P., Hagen, M.E., von Diemen, L., Pechansky, F., 2018. Active Brazilian crack cocaine users: Nutritional, anthropometric, and drug use profiles. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 40, 354–360.
- Evans, C.J., 2004. Secrets of the opium poppy revealed. *Neuropharmacology* 47, 293–299.
- Fasolino, M., Zhou, Z., 2017. The Crucial Role of DNA Methylation and MeCP2 in Neuronal Function. *Genes (Basel)*. 8, E141.
- Fatsini, E., Rey, S., Ibarra-Zatarain, Z., Mackenzie, S., Duncan, N.J., 2017. Dominance behaviour in a non-aggressive flatfish, Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and brain mRNA abundance of selected transcripts. *PLoS One* 12, 1–22.
- Feige, C., Miron, J., 2005. The opium wars, opium legalization and opium consumption in China. *Appl. Econ. Lett.* 15, 911–913.
- Fenalti, G., Zatsepin, N.A., Betti, C., Giguere, P., Han, G.W., Ishchenko, A., Liu, W., Guillemyn, K., Zhang, H., James, D., Wang, D., Weierstall, U., Spence, J.C.H., Boutet, S., Messerschmidt, M., Williams, G.J., Gati, C., Yefanov, O.M., White, T.A., Oberthuer, D., Metz, M., Yoon, C.H., Barty, A., Chapman, H.N., Basu, S., Coe, J., Conrad, C.E., Fromme, R., Fromme, P., Tourwé, D., Schiller, P.W., Roth, B.L., Ballet, S., Katritch, V., Stevens, R.C., Cherezov, V., 2015. Structural basis for bifunctional peptide recognition at human  $\delta$ -opioid receptor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 265–268.
- Feng, J., Wilkinson, M., Liu, X., Purushothaman, I., Ferguson, D., Vialou, V., Maze, I., Shao, N., Kennedy, P., Koo, J., Dias, C., Laitman, B., Stockman, V., Laplant, Q., Cahill, M.E., Nestler, E.J., Shen, L., 2014. Chronic cocaine-regulated epigenomic changes in mouse nucleus accumbens. *Genome Biol.* 15, R65.
- Fields, H., 2004. State-dependent opioid control of pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 565–575.
- Fishman, M.C., 2001. Zebrafish — the Canonical. *Science (80- )*. 294, 1290.
- Flagel, S.B., Chaudhury, S., Waselus, M., Kelly, R., Sewani, S., Clinton, S.M., 2016. Genetic background and epigenetic modifications in the core of the nucleus accumbens predict addiction-like behavior in a rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 2861–2870.
- Fonseca, A.C., Ferro, J.M., 2013. Drug Abuse and Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13(2), 325.
- Fragou, D., Zanos, P., Koidou, S., Njau, S., Kitchen, I., Bailey, A., Kovatsi, L., 2013. Effect of chronic heroin and cocaine administration on global DNA methylation in brain and liver. *Toxicol. Lett.* 218, 260–265.
- Fridell, M., Bäckström, M., Hesse, M., Krantz, P., Perrin, S., Nyhlén, A., 2019. Prediction of psychiatric comorbidity on premature death in a cohort of patients with substance use disorders: A 42-year follow-up. *BMC Psychiatry* 19, 1–13.
- Froehlicher, M., Liedtke, A., Groh, K.J., Neuhaus, S.C.F., Segner, H., Eggen, R.I.L., 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: Promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat. Toxicol.* 95, 307–319.
- García-López, Á., Fernández-Pasquier, V., Couto, E., Canario, A.V.M., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G., 2006. Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 343–351.



- Garcia-Perez, D., Saez-Belmonte, F., Laorden, M., Nuñez, C., Milanés, M., 2012. Morphine administration modulates expression of Argonaute 2 and transcription factors involved in midbrain dopaminergic neurons. *Br. J. Pharmacol.* 168, 1889–1901.
- Ge, S.X., Jung, D., Yao, R., 2020. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* 36, 2628–2629.
- Ghitza, U.E., Zhai, H., Wu, P., Airavaara, M., Shaham, Y., Lu, L., 2010. Role of BDNF and GDNF in drug reward and relapse : A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 157–171.
- Ghosh, S., Hui, S.P., Reeves, D., 2016. Regeneration of Zebrafish CNS : Adult Neurogenesis. *Neural Plast.* 1–21.
- Goldstein, R.A., DesLauriers, C., Burda, A., Johnson-Arbor, K., 2009. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. *Semin. Diagn. Pathol.* 26, 10–17.
- Gomes, I., Gupta, A., Filipovska, J., Szeto, H.H., Pintar, J.E., Devi, L.A., 2004. A role for heterodimerization of  $\mu$  and  $\delta$  opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci* 101, 5135–5139.
- González-Nunez, V., Arsequell, G., Szemenyei, E., Toth, G., Valencia, G., Rodriguez, R.E., 2005. Binding profile of the endogenous novel heptapeptide Met-enkephalin-Gly-Tyr in zebrafish and rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 862–867.
- Gonzalez-Nunez, V., Barrallo, A., Traynor, J.R., Rodriguez, R.E., 2006. Characterization of opioid binding sites in zebrafish brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 900–904.
- Gonzalez-Nunez, V., Fernández de Velasco, E.M., Arsequell, G., Valencia, G., Rodriguez, R.E., 2007. Identification of dynorphin a from zebrafish: A comparative study with mammalian dynorphin A. *Neuroscience* 144, 675–684.
- Gonzalez-Nunez, V., Gonzalez-Sarmiento, R., Rodríguez, R.E., 2003a. Cloning and characterization of a full-length pronociceptin in zebrafish: Evidence of the existence of two different nociceptin sequences in the same precursor. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1629, 114–118.
- Gonzalez-Nunez, Veronica., Gonzalez-Sarmiento, R., Rodríguez, R.E., 2003b. Identification of two proopioidmelanocortin genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol. Brain Res.* 120, 1–8.
- Gonzalez-Nunez, V., González, A.J., Barreto-Valer, K., Rodríguez, R.E., 2013. In Vivo Regulation of the  $\mu$  Opioid Receptor: Role of the Endogenous Opioid Agents. *Mol. Med.* 19, 7–17.
- Gonzalez-Nunez, V., Rodríguez, R.E., 2009. The zebrafish: A model to study the endogenous mechanisms of pain. *ILAR J.* 50, 373–386.
- Gonzalez-Nuñez, V., Toth, G., Rodríguez, R.E., 2007. Endogenous heptapeptide Met-enkephalin-Gly-Tyr binds differentially to duplicate delta opioid receptors from zebrafish. *Peptides* 28, 2340–2347.
- González, B., Pantoja, C.R.G., Sosa, M.H., Vitullo, A.D., Bisagno, V., González, C.R., 2018. Cocaine alters the mouse testicular epigenome with direct impact on histone acetylation and DNA methylation marks. *Reprod. Biomed. Online* 37, 269–27.
- González, I., Tumuluru, S., Gnzález-Torres, M.Á., Gaviria, M., 2015. Cocaína: una revisión de la adicción y el tratamiento. *Rev. Asoc. Esp. Neuropsiq* 35, 555–571.
- Gonzalez Nuñez, V., Gonzalez Sarmiento, R., Rodríguez, R.E., 2003c. Characterization of zebrafish proenkephalin reveals novel opioid sequences. *Mol. Brain Res.* 114, 31–39.
- Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, C.A., 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 36, 3420–3435.
- Grandy, D.K., Miller, G.M., Li, J.X., 2016. “TAARgeting Addiction”-The Alamo Bears Witness to Another Revolution. An Overview of the Plenary Symposium of the 2015 Behavior, Biology and Chemistry Conference. *Drug Alcohol Depend.* 159, 9–16.

## Bibliografía

- Gray, A.C., Coupar, I.M., White, P.J., 2006. Comparison of opioid receptor distributions in the rat central nervous system. *Life Sci.* 79, 674–685.
- Guzmán, J.M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C.C., Mañanós, E.L., 2008. Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 285–297.
- Guzmán, J.M., Ramos, J., Mylonas, C.C., Mañanós, E.L., 2011. Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture* 316, 121–128.
- Guzmán, J.M., Rubio, M., Ortiz-Delgado, J.B., Klenke, U., Kight, K., Cross, I., Sánchez-Ramos, I., Ríaza, A., Rebordinos, L., Sarasquete, C., Zohar, Y., Mañanós, E.L., 2009. Comparative gene expression of gonadotropins (FSH and LH) and peptide levels of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in the pituitary of wild and cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstocks. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 153, 266–277.
- Haghighparast, A., Fatahi, Z., Alamdary, S.Z., Reisi, Z., Khodagholi, F., 2014. Changes in the levels of p-ERK, p-CREB, and c-fos in rat mesocorticolimbic dopaminergic system after morphine-induced conditioned place preference: The role of acute and subchronic stress. *Cell. Mol. Neurobiol.* 34, 277–288.
- Han, M., Bolaños, C., Green, T., Olson, V., Neve, R., Liu, R., Aghajanian, G., Nestler, E., 2006. Role of cAMP response element-binding protein in the rat locus ceruleus: regulation of neuronal activity and opiate withdrawal behaviors. *J. Neurosci.* 26, 4624–4629.
- Heukeshoven, J., Dernick, R., 1985. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103–112.
- Hoffmann, H.M., Nadal, R., Vignes, M., Ortiz, J., 2012. Chronic cocaine self-administration modulates ERK1/2 and CREB responses to dopamine receptor agonists in striatal slices. *Addict. Biol.* 17, 565–575.
- Hong, H., Kim, B.S., Im, H., 2016. Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. *Int. Neurol. J.* 20, 2–7.
- Hong, W.C., Amara, S.G., 2010. Membrane cholesterol modulates the outward facing conformation of the dopamine transporter and alters cocaine binding. *J. Biol. Chem.* 285, 32616–32626.
- Howell, L.L., Carroll, F.I., Votaw, J.R., Goodman, M.M., Kimmel, H.L., 2007. Effects of combined dopamine and serotonin transporter inhibitors on cocaine self-administration in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 757–765.
- Huber, W., Carey, V.J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B.S., Bravo, H.C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K.D., Irizarry, R.A., Lawrence, M., Love, M.I., MacDonald, J., Obenchain, V., Oleš, A.K., Pagès, H., Reyes, A., Shannon, P., Smyth, G.K., Tenenbaum, D., Waldron, L., Morgan, M., 2015. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* 12, 115–121.
- Hwang, C.K., Kim, C.S., Kim, D.K., Law, P.Y., Wei, L.N., Loh, H.H., 2010. Up-regulation of the  $\mu$ -opioid receptor gene is mediated through chromatin remodeling and transcriptional factors in differentiated neuronal cells. *Mol. Pharmacol.* 78, 58–68.
- Hwang, C.K., Song, K.Y., Kim, C.S., Choi, H.S., Guo, X.-H., Law, P.-Y., Wei, L.-N., Loh, H.H., 2007. Evidence of Endogenous Mu Opioid Receptor Regulation by Epigenetic Control of the Promoters. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4720–4736.
- Isorna, E., M'Rabet, A. El, Confente, F., Falcón, J., Muñoz-Cueto, J.A., 2009. Cloning and expression of arylalkylamine N-acetyltransferase-2 during early development and metamorphosis in the sole *Solea senegalensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 97–102.
- Jenney, C.B., Alexander, D.N., Jones, B.C., Erica, L., Grigson, P.S., 2016. Neural and Behavioral Sciences , Penn State Hershey College of Medicine , The. *Physiol. Behav.* 167, 282–288.

- Jimenez-Gonzalez, A., García-Concejo, A., López-Benito, S., Gonzalez-Nunez, V., Arévalo, J.C., Rodriguez, R.E., 2016. Role of morphine, miR-212/132 and mu opioid receptor in the regulation of Bdnf in zebrafish embryos. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1860, 1308–1316.
- Joanna, L., Sylwia, T., Gryzińska, M., Piotr, L., Ewa, K., Jolanta, O.G., Malgorzata, D., Malgorzata, L., Kotlinska, J.H., 2017. Mephedrone exposure in adolescent rats alters the rewarding effect of morphine in adults. *Eur. J. Pharmacol.* 810, 63–69.
- Johnson, S., North, R., 1992. Opioids Excite Dopamine Neurons by Hyperpolarization Interneurons. *J. Neurosci.* 12, 4.
- Jones, B.C., Wheeler, D.S., Beard, J.L., Grigson, P.S., 2002. Iron deficiency in rats decreases acquisition of and suppresses responding for cocaine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 813–819.
- Just, J.M., Bleckwenn, M., Schnakenberg, R., Skatulla, P., Weckbecker, K., 2016. Drug-related celebrity deaths : A cross-sectional study. *Subst. Abuse Treat. Prev. Policy* 11, 1–6.
- Kais, B., Ottermanns, R., Scheller, F., Braunbeck, T., 2018. Modification and quantification of in vivo EROD live-imaging with zebrafish (*Danio rerio*) embryos to detect both induction and inhibition of CYP1A. *Sci. Total Environ.* 615, 330–347.
- Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C., Braunbeck, T., 2013. DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-Implications for the fish embryo test (FET). *Aquat. Toxicol.* 140–141, 229–238.
- Kampman, K.M., 2010. What ' s New in the Treatment of Cocaine Addiction ? *Curr. Psychiatry Rep.* 12, 441–447.
- Karila, L., Reynaud, M., Aubin, H., Rolland, B., Guardia, D., 2011. Pharmacological Treatments for Cocaine Dependence : Is There Something New ? *Pharm. Des.* 17, 1359–1368.
- Kelz, M.B., Nestler, E.J., 2000. ΔFosB: A molecular switch underlying long-term neural plasticity. *Curr. Opin. Neurol.* 13, 715–720.
- Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J.A., Van Der Lee, R., Bessy, A., Chèneby, J., Kulkarni, S.R., Tan, G., Baranasic, D., Arenillas, D.J., Sandelin, A., Vandepoele, K., Lenhard, B., Ballester, B., Wasserman, W.W., Parcy, F., Mathelier, A., 2018. JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* 46, D260–D266.
- Kilpatrick, G.J., Smith, T.W., 2005. Morphine-6-glucuronide: Actions and mechanisms. *Med. Res. Rev.* 25, 521–544.
- Kim, S.T., Park, T., 2019. Acute and chronic effects of cocaine on cardiovascular health. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1–22.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Dev. Dyn.* 10.
- Klee, E.W., Schneider, H., Clark, K.J., Karpyak, V.M., Warner, D.O., Ekker, S.C., 2012. Zebrafish : a model for the study of addiction genetics. *Hum Genet* 131, 977–1008.
- Koob, G.F., Ahmed, S.H., Boutrel, B., Chen, S.A., Kenny, P.J., Markou, A., Dell, L.E.O., Parsons, L.H., Sanna, P.P., 2004. Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 739–749.
- Korsgaard, H.O., Torgersen, S., Wentzel-Larsen, T., Ulberg, R., 2016. Substance abuse and personality disorder comorbidity in adolescent outpatients: Are girls more severely ill than boys? *Child Adolesc. Psychiatry Ment. Health* 10, 1–9.
- Kosten, T.R., Domingo, C.B., 2013. Can you vaccinate against substance abuse ? *Expert Opin. Biol. Ther.* 13, 1093–1097.
- Kouros, D., Tahereh, H., Mohammadreza, A., Minoo, M.Z., 2010. Opium and heroin alter biochemical parameters of human's serum. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 36, 135–139.

## Bibliografía

- Lange, R.A., Hillis, L.D., 2001. Cardiovascular complications of cocaine use. *N. Engl. J. Med* 345, 351–359.
- Lau, B., Bretaud, S., Huang, Y., Lin, E., Guo, S., 2006. Dissociation of food and opiate preference by a genetic mutation in zebrafish. *Genes, Brain Behav.* 5, 497–505.
- Law, P., Wong, Y.H., Loh, H.H., 2000. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 389–430.
- Lee, T.I., Young, R.A., 2000. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet* 77–137.
- Lehrmann, E., Colantuoni, C., Deep-Soboslay, A., Becker, K.G., Lowe, R., Huestis, M.A., Hyde, T.M., Kleinman, J.E., Freed, W.J., 2006. Transcriptional changes common to human cocaine cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS One* 1.
- Leishman, E., Kokesh, K.J., Bradshaw, H.B., 2013. Lipids and addiction: How sex steroids, prostaglandins, and cannabinoids interact with drugs of abuse. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1282, 25–38.
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P., 2015. SMART : recent updates , new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res.* 43, 257–260.
- Levitt, E.S., Clark, M.J., Jenkins, P.M., Martens, J.R., Traynor, J.R., 2009. Differential effect of membrane cholesterol removal on  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors. A parallel comparison of acute and chronic signaling to adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 284, 22108–22122.
- Li, L.-C., Dahiya, R., 2002. MethPrimer : designing primers for methylation. *Bioinformatics* 18, 1427–1431.
- Listos, J., Baranowska-bosiacka, I., Talarek, S., Listos, P., Orzelska, J., Fidecka, S., Gutowska, I., Kolasa, A., Rybicka, M., Chlubek, D., 2013. The effect of perinatal lead exposure on dopamine receptor D2 expression in morphine dependent rats. *Toxicology* 310, 73–83.
- Listos, J., Łupina, M., Talarek, S., Mazur, A., Orzelska-Górka, J., Kotlińska, J., 2019. The mechanisms involved in morphine addiction: An overview. *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Liu, H., Wei, J., Liu, M., Wu, S., Ma, C., Liu, C., Huang, K., Zhang, X., Guo, R., Zhang, K., Xin, W., 2018. Epigenetic upregulation of CXCL12 expression contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Exp. Neurol.* 306, 55–63.
- Lizasoain, I., Moro, M.A., Lorenzo, P., 2002. Cocaína: Aspectos farmacológicos. *Adicciones* 14, 57–64.
- López-Patiño, M.A., Yu, L., Cabral, H., Zhdanova, I. V., 2008. Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiol. Behav.* 93, 160–171.
- Lotsch, J., Weiss, M., Ahne, G., Kobal, G., Geisslinger, G., 1999. Pharmacokinetic Modeling of M6G Formation After Oral Administration of Morphine in Healthy Volunteers. *Anesthesiology* 90, 1026–1038.
- Lourenço, J., Marques, S., Carvalho, F.P., Oliveira, J., Malta, M., Santos, M., Gonçalves, F., Pereira, R., Mendo, S., 2017. Uranium mining wastes: The use of the Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET) test to evaluate toxicity and risk of environmental discharge. *Sci. Total Environ.* 605–606, 391–404.
- Lucantonio, F., Stalnaker, T.A., Shaham, Y., Niv, Y., Schoenbaum, G., 2012. The impact of orbitofrontal dysfunction on cocaine addiction. *Nat. Neurosci.* 15, 358–366.
- Lush, M.E., Piotrowski, T., 2014. Sensory hair cell regeneration in the zebrafish lateral line. *Dev. Dyn.* 243, 1187–1202.
- Macey, T.A., Lowe, J.D., Chavkin, C., 2006. Mu opioid receptor activation of ERK1/2 is GRK3 and arrestin dependent in striatal neurons. *J. Biol. Chem.* 281, 34515–34524.
- Madeira, F., Park, Y. mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., D. Finn, R., Lopez, R., 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, 636–641.

- Madras, B.K., 2018. The President ' s Commission on Combating Drug Addiction and the Opioid Crisis : Origins and Recommendations 00, 1–3.
- Mahapatra, A., 2010. Overeating, obesity, and dopamine receptors. *ACS Chem. Neurosci.* 1, 346–347.
- Mahler, J., Filippi, A., Driever, W., 2010. DeltaA/DeltaD regulate multiple and temporally distinct phases of notch signaling during dopaminergic neurogenesis in zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 16621–16635.
- Mañanós, E., Ferreiro, I., Bolón, D., Guzmán, J., Mylonas, C., Ríaza Carcamo, A., 2007. Different responses of Senegalese sole *Solea senegalensis* broodstock to a hormonal spawning induction therapy, depending on their wild or captive-reared origin | Request PDF. *Proc. Aquac. Eur.* 07, Istanbul, Turkey. 330–331.
- Manglik, A., Kruse, A.C., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Mathiesen, J.M., Sunahara, R.K., 2012. Crystal structure of the m -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 321–326.
- Manna, P.R., Stocco, D.M., 2007. Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: Transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *J. Mol. Endocrinol.* 39, 261–277.
- Mantsch, J.R., Vranjkovic, O., Twining, R.C., Gasser, P.J., Mcreynolds, J.R., Blacktop, J.M., 2014. Neurobiological mechanisms that contribute to stress-related cocaine use. *Neuropharmacology* 76, 383–394.
- Maraj, S., Figueredo, V.M., Morris, D.L., 2010. Cocaine and the heart. *Clin. Cardiol.* 33, 264–269.
- Martell, B.A., Orson, F.M., Poling, J., Mitchell, E., Rossen, R.D., Gardner, T., Kosten, T.R., 2009. Cocaine Vaccine for the Treatment of Cocaine Dependence in Methadone-Maintained Patients. *Arch. Gen. Psychiatry* 66, 1116–1123.
- Martin, W.R., 1984. Pharmacology of Opioids. *Pharmacol. Rev.* 35, 283–323.
- Mashayekhi, F.J., Rasti, M., Khoshdel, Z., Owji, A.A., 2018. Expression Levels of the Tyrosine Hydroxylase Gene and Histone Modifications Around its Promoter in the Locus Coeruleus and Ventral Tegmental Area of Rats during Forced Abstinence from Morphine. *Eur. Addict. Res.* 304–311.
- Mashayekhi, F.J., Rasti, M., Rahvar, M., Mokarram, P., Namavar, M.R., Owji, A.A., 2012. Expression levels of the BDNF gene and histone modifications around its promoters in the ventral tegmental area and locus ceruleus of rats during forced abstinence from morphine. *Neurochem. Res.* 37, 1517–1523.
- Mateos-García, A., Roger-Sánchez, C., Rodríguez-Arias, M., Miñarro, J., Aguilar, M.A., Manzanedo, C., Arenas, M.C., 2015. Higher sensitivity to the conditioned rewarding effects of cocaine and MDMA in High-Novelty-Seekers mice exposed to a cocaine binge during adolescence. *Psychopharmacology (Berl)*. 232, 101–113.
- Mathur, P., Guo, S., 2010. Neurobiology of Disease Use of zebra fi sh as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiol. Dis.* 40, 66–72.
- Maze, I., Covington, E., Dietz, D., LaPlant, Q., Renthal, W., Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovsky A, Schaefer A, N.E., 2010. Essential Role of the Histone. *Science (80- )*. 213, 213–217.
- Maze, I., Feng, J., Wilkinson, M.B., Sun, H., Shen, L., Nestler, E.J., 2011. Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3035–3040.
- Mazoit, J.X., Butscher, K., Samii, K., 2007. Morphine in postoperative patients: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of metabolites. *Anesth. Analg.* 105, 70–78.
- McClung, C.A., Nestler, E.J., 2003. Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and ΔFosB. *Nat. Neurosci.* 6, 1208–1215.
- Mersereau, E.J., Boyle, C.A., Poitra, S., Espinoza, A., Seiler, J., Longie, R., Delvo, L., Szarkowski, M., Maliske, J., Chalmers, S., Darland, D.C., Darland, T., 2016. Longitudinal effects of embryonic exposure to cocaine on morphology, cardiovascular physiology, and behavior in zebrafish. *Int. J.*

## Bibliografía

- Mol. Sci. 17.
- Mersereau, E.J., Poitra, S.L., Espinoza, A., Crossley, D.A., Darland, T., 2015. The effects of cocaine on heart rate and electrocardiogram in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 172–173, 1–6.
- Mi, H., Muruganujan, A., Casagrande, J.T., Thomas, P.D., 2013. Large-scale gene function analysis with the panther classification system. *Nat. Protoc.* 8, 1551–1566.
- Mi, H., Thomas, P., 2009. PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods Mol. Biol.* 563, 123–140.
- Mitra, S., Sinatra, R.S., 2004. Perioperative management of acute pain in the opioid-dependent patient. *Anesthesiology* 101, 212–227.
- Moises, C., Rusin, I., Macdonaldle, L., 1994. Mu- and kappa-opioid receptors selectively reduce the same transient components of high-threshold calcium current in rat dorsal root ganglion sensory neurons. *J. Neurosci.* 14, 5903–5916.
- Monaco, A., Capriello, T., Grimaldi, M.C., Schiano, V., Ferrandino, I., 2017. Neurodegeneration in zebrafish embryos and adults after cadmium exposure. *Eur. J. Histochem.* 61, 2–5.
- Moratalla, R., 2008. Neurobiología de la cocaína. *Trastor. Adict.* 10, 143–150.
- Moratalla, R., Xu, M., Tonegawa, S., Graybiel, A.M., 1996. Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14928–14933.
- Motahari, A.A., Sahraei, H., Meftahi, G.H., 2016. Role of nitric oxide on dopamine release and morphine-dependency. *Basic Clin. Neurosci.* 7, 283–290.
- Musacchio, J.M., 2013. Enzymes Involved in the Biosynthesis and Degradation of Catecholamines. In: *Biochemistry of Biogenic Amines*. Springer US, pp. 1–35.
- Narita, Minoru, Nagumo, Y., Hashimoto, S., Narita, Michiko, Khotib, J., Miyatake, M., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Nakamachi, T., Shioda, S., Suzuki, T., 2006. Direct Involvement of Orexinergic Systems in the Activation of the Mesolimbic Dopamine Pathway and Related Behaviors Induced by Morphine 26, 398–405.
- Nash, B., Tarn, K., Irollo, E., Luchetta, J., Festa, L., Halcrow, P., Geiger, J.D., Meucci, O., 2019. Morphine-Induced Modulation of Endolysosomal Iron Mediates Upregulation of Ferritin Heavy Chain in Cortical Neurons. *eNeuro* 6.
- Navarro-Zaragoza, J., Ros-Simó, C., Milanés, M.V., Valverde, O., Laorden, M.L., 2019. Binge ethanol and MDMA combination exacerbates HSP27 and Trx-1 (biomarkers of toxic cardiac effects) expression in right ventricle. *Life Sci.* 220, 50–57.
- Nelson, S., Salvator, A.N.N., Singer, L.T., 2004. Cocaine , Anemia , and Neurodevelopmental Outcomes in Children : A Longitudinal Study. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 25, 1–9.
- Nestler, E.J., 2001. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128.
- Nestler, E.J., 2004a. Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 47, 24–32.
- Nestler, E.J., 2004b. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 210–218.
- Nestler, E.J., 2014. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 76, 259–268.
- Nestler, E.J., 2016. Reflections on: “A general role for adaptations in G-Proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic actions of morphine and cocaine on neuronal function.” *Brain Res.* 1645, 71–74.
- Nestler, E.J., Lüscher, C., 2019. The Molecular Basis of Drug Addiction: Linking Epigenetic to Synaptic and Circuit Mechanisms. *Neuron* 102, 48–59.



- Nicolas, C.S., Amici, M., Bortolotto, Z.A., Doherty, A., Csaba, Z., Fafouri, A., Dournaud, P., Gressens, P., Collingridge, G.L., 2013. The role of JAK-STAT signaling within the CNS The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAK-STAT* 2, e22925.
- NIDA, N.I. on D.A., 2016. How does cocaine produce its effects? [WWW Document]. URL: <https://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/cocaine/how-does-cocaine-produce-its-effects> (accessed 3.2.20).
- Nüsslein-Volhard, C. and Dahm, R., 2002. Zebrafish: a practical approach. New York: Oxford University Press.
- Otte, J.C., Schmidt, A.D., Hollert, H., Braunbeck, T., 2010. Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 100, 38–50.
- Özmen, I., Nazıroğlu, M., Alici, H.A., Şahin, F., Cengiz, M., Eren, I., 2007. Spinal morphine administration reduces the fatty acid contents in spinal cord and brain by increasing oxidative stress. *Neurochem. Res.* 32, 19–25.
- Pacifici, G.M., 2016. Metabolism and pharmacokinetics of morphine in neonates: A review. *Clinics* 71, 474–480.
- Parker, M.O., Brock, A.J., Walton, R.T., Brennan, C.H., 2013. The role of zebrafish (*Danio rerio*) in dissecting the genetics and neural circuits of executive function. *Front. Neural Circuits* 7, 63.
- Parolini, M., Bini, L., Magni, S., Rizzo, A., Ghilardi, A., Landi, C., Armini, A., Del Giacco, L., Binelli, A., 2018. Exposure to cocaine and its main metabolites altered the protein profile of zebrafish embryos. *Environ. Pollut.* 232, 603–614.
- Parolini, M., Ghilardi, A., Della Torre, C., Magni, S., Prosperi, L., Calvagno, M., Del Giacco, L., Binelli, A., 2017. Environmental concentrations of cocaine and its main metabolites modulated antioxidant response and caused cyto-genotoxic effects in zebrafish embryo cells. *Environ. Pollut.* 226, 504–514.
- Phillips, K., Luk, A., Soor, G.S., Abraham, J.R., Leong, S., Butany, J., 2009. Cocaine cardiotoxicity: A review of the pathophysiology, pathology, and treatment options. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.*
- Pierce, R.C., Fant, B., Swinford-Jackson, S.E., Heller, E.A., Berrettini, W.H., Wimmer, M.E., 2018. Environmental, genetic and epigenetic contributions to cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology* 43, 1471–1480.
- Pinal-Seoane, N., Martin, I.R., Gonzalez-Nuñez, V., Fernandez de Velasco, E.M., Alvarez, F.A., Sarmiento, R.G., Rodriguez, R.E., 2006. Characterization of a new duplicate  $\delta$ -opioid receptor from zebrafish. *J. Mol. Endocrinol.* 37, 391–403.
- Pitchers, K.K., Vialou, V., Nestler, E.J., Laviolette, S.R., Lehman, M.N., Coolen, L.M., 2013. Natural and Drug Rewards Act on Common Neural Plasticity Mechanisms with FosB as a Key Mediator. *J. Neurosci.* 33, 3434–3442.
- Popesku, J.T., Martyniuk, C.J., Mennigen, J., Xiong, H., Zhang, D., Xia, X., Cossins, A.R., Trudeau, V.L., 2008. The goldfish (*Carassius auratus*) as a model for neuroendocrine signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 293, 43–56.
- Prieto, C., De Las Rivas, J., 2006. APID: Agile protein interaction DataAnalyzer. *Nucleic Acids Res.* 34, 298–302.
- Qiu, W., Liu, S., Yang, F., Dong, P., Yang, M., Wong, M., Zheng, C., 2019. Metabolism disruption analysis of zebrafish larvae in response to BPA and BPA analogs based on RNA-Seq technique. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 174, 181–188.
- Qiu, Y., Wang, Y., Law, P.Y., Chen, H.Z., Loh, H.H., 2011. Cholesterol regulates  $\mu$ -opioid receptor-induced  $\beta$ -arrestin 2 translocation to membrane lipid rafts. *Mol. Pharmacol.* 80, 210–218.
- Quinlan, A.R., Hall, I.M., 2010. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26, 841–842.

## Bibliografía

- Redman, M., 2011. Cocaine: What is the Crack? A Brief History of the Use of Cocaine as an Anesthetic. *Anesthesiol. Pain Med.* 1, 95–97.
- Renthal, W., Kumar, A., Xiao, G., Wilkinson, M., Iii, H.E.C., Maze, I., Sikder, D., Robison, A.J., Laplant, Q., Dietz, D.M., Russo, S.J., Vialou, V., Chakravarty, S., Kodadek, T.J., Stack, A., Kabbaj, M., Nestler, E.J., 2009. Genome-wide Analysis of Chromatin Regulation by Cocaine Reveals a Role for Sirtuins. *Neuron* 62, 335–348.
- Renthal, W., Maze, I., Krishnan, V., Covington, H.E., Xiao, G., Kumar, A., Russo, S.J., Graham, A., Tsankova, N., Kippin, T.E., Kerstetter, K.A., Neve, R.L., Haggarty, S.J., McKinsey, T.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., Nestler, E.J., 2007. Histone Deacetylase 5 Epigenetically Controls Behavioral Adaptations to Chronic Emotional Stimuli. *Neuron* 56, 517–529.
- Riesco, M.F., Valcarce, D.G., Martínez-Vázquez, J.M., Martín, I., Calderón-García, A.Á., Gonzalez-Nunez, V., Robles, V., 2019. Male reproductive dysfunction in *Solea senegalensis*: New insights into an unsolved question. *Reprod. Fertil. Dev.* 31, 1104–1115.
- Riezzo, I., Fiore, C., De Carlo, D., Pascale, N., Neri, M., Turillazzi, E., Fineschi, V., 2012. Side Effects of Cocaine Abuse: Multiorgan Toxicity and Pathological Consequences. *Curr. Med. Chem.* 19, 5624–5646.
- Rivas-Boyer, Á.A., Herrero-Turrión, M.J., Gonzalez-Nunez, V., Sánchez-Simón, F.M., Barreto-Valer, K., Rodríguez, R.E., 2011. Pharmacological characterization of a nociceptin receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *J. Mol. Endocrinol.* 46, 111–123.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- Robison, A.J., Nestler, E.J., 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 623–637.
- Rodríguez-Gómez, F.J., Rendón-Unceta, M.C., Sarasquete, C., Muñoz-Cueto, J.A., 2000. Localization of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *J. Chem. Neuroanat.* 19, 17–32.
- Rojas-Muñoz, A., Bernad Miana, A., Izpisua Belmonte, J., 2007. El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investig. Cienc.* 62–69.
- Rondou, P., Haegeman, G., Van Craenenbroeck, K., 2010. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1971–1986.
- Rubio, F.J., Quintana-Feliciano, R., Warren, B.L., Li, X., Witonsky, K.F.R., Valle, F.S. del, Selvam, P. V., Caprioli, D., Venniro, M., Bossert, J.M., Shaham, Y., Hope, B.T., 2019. Prelimbic cortex is a common brain area activated during cue-induced reinstatement of cocaine and heroin seeking in a polydrug self-administration rat model. *Eur. J. Neurosci.* 49, 165–178.
- Ryu, S., Holzschuh, J., Mahler, J., Driever, W., 2006. Genetic analysis of dopaminergic system development in zebrafish. *J. Neural Transm. Suppl.* 61–66.
- Sadat-shirazi, M., Monfared, N., Matloob, M., 2019. Possible involvement of nucleus accumbens D1-like dopamine receptors in the morphine-induced condition place preference in the offspring of morphine abstinent rats. *Life Sci.* 233, 116712.
- Salud, O.M. de la, 2004. Neurociencia del consumo y dependencia de sustancias psicoactivas. *Neurociencia del Consumo y Dependencia de Sustancias. Organ. Mund. la Salud.*
- Salvatore, M.F., Calipari, E.S., Jones, S.R., 2016. Regulation of Tyrosine Hydroxylase Expression and Phosphorylation in Dopamine Transporter-Deficient Mice. *ACS Chem. Neurosci.* 7, 941–951.
- Schaefer, C.P., Arkwright, N.B., Jacobs, L.M., Jarvis, C.K., Hunn, C., Largent-milnes, T.M., Tome, M.E., Davis, T.P., 2018. Chronic morphine exposure potentiates p- glycoprotein trafficking from nuclear reservoirs in cortical rat brain microvessels. *PLoS One* 13, 1–16.
- Schindler, C.W., Goldberg, S.R., 2012. Accelerating cocaine metabolism as an approach to the treatment of cocaine abuse and toxicity. *Futur. Med. Chem.* 4, 163–175.



- Schwartz, B.G., Rezkalla, S., Kloner, R.A., 2010. Cardiovascular effects of cocaine. *Circulation* 122, 2558–2569.
- Schweitzer, J., Löhr, H., Filippi, A., Driever, W., 2012. Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 256–268.
- Severtson, S.G., Bartelson, B.B., Davis, J.M., Schneider, M.F., Chilcoat, H., Coplan, P.M., Surratt, H., Dart, R.C., Health, D., Authority, H., Mountain, R., 2013. Reduced Abuse, Therapeutic Errors, and Diversion Following Reformulation of Extended-Release Oxycodone in 2010. *J. Pain* 14, 1122–1130.
- Sharma, R., Biedenharn, K.R., Fedor, J.M., Agarwal, A., 2013. Lifestyle factors and reproductive health: Taking control of your fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11, 1–15.
- Shi, X., Yao, D., Gosnell, B.A., Chen, C., 2012. Lipidomic profiling reveals protective function of fatty acid oxidation in cocaine-induced hepatotoxicity. *J. Lipid Res.* 53, 2318–2330.
- Shields, L.B.E., Rolf, C.M., Hunsaker, J.C., 2015. Sudden Death Due To Acute Cocaine Toxicity — Excited Delirium in a Body Packer. *J. Forensic Sci.* 60, 1647–1651.
- Shorter, D., Domingo, C.B., Kosten, T.R., 2015. Emerging drugs for the treatment of cocaine use disorder: A review of neurobiological targets and pharmacotherapy. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 20, 15–29.
- Sinha, R., 2013. The clinical neurobiology of drug craving. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 649–654.
- Skinner, M.K., 2011. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. *Epigenetics* 6, 838–842.
- Snyder, S.H., 1996. *Drugs and the brain*. Scientific American Library.
- Spector, S., Vesell, E.S., 1971. Disposition of morphine in man. *Science* (80-. ). 174, 421–422.
- Spronk, D.B., van Wel, J.H.P., Ramaekers, J.G., Verkes, R.J., 2013. Characterizing the cognitive effects of cocaine: A comprehensive review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37, 1838–1859.
- Stein, C., Comisel, K., Haimerl, E., Yassouridis, A., Lehrberger, K., Herz, A., Peter, K., 1991. Analgesic Effect of Intraarticular Morphine after Arthroscopic Knee Surgery. *N. Engl. J. Med.* 325, 1123–1126.
- Stein, C., Schäfer, M., Machelska, H., 2000. Why is morphine not the ultimate analgesic and what can be done to improve it? *J. Pain* 1, 51–56.
- Stolzenberg, D.S., Numan, M., 2011. Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 826–847.
- Sun, H.S., Maze, I., Dietz, D.M., Scobie, K.N., Kennedy, P.J., Damez-Werno, D., Neve, R.L., Zachariou, V., Shen, L., Nestler, E.J., 2012. Morphine epigenomically regulates behavior through alterations in histone H3 lysine 9 dimethylation in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 32, 17454–17464.
- Sun, L.S., Quamina, A., 2003. Perinatal cocaine exposure stimulates the expression and activation of CREB in the neonatal rat heart. *Pediatr. Res.* 53, 500–506.
- Sverrisdóttir, Eva, Foster, D.J.R., Upton, R.N., Olesen, A.E., Lund, T.M., Gabel-Jensen, C., Drewes, A.M., Christrup, L.L., Kreilgaard, M., 2015a. Modelling concentration-analgesia relationships for morphine to evaluate experimental pain models. *Eur. J. Pharm. Sci.* 66, 50–58.
- Sverrisdóttir, Eva., Lund, T.M., Olesen, A.E., Drewes, A.M., Christrup, L.L., Kreilgaard, M., 2015b. A review of morphine and morphine-6-glucuronide's pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships in experimental and clinical pain. *Eur. J. Pharm. Sci.* 74, 45–62.
- Teles, M.C., Cardoso, S.D., Oliveira, R.F., 2016. Social plasticity relies on different neuroplasticity mechanisms across the brain social decision-making network in zebrafish. *Front. Behav. Neurosci.* 10.

## Bibliografía

- Thanos, P.K., Cho, J., Kim, R., Michaelides, M., Primeaux, S., Bray, G., Wang, G.J., Volkow, N.D., 2011. Bromocriptine increased operant responding for high fat food but decreased chow intake in both obesity-prone and resistant rats. *Behav. Brain Res.* 217, 165–170.
- Thomas Yeo, B.T., Krienen, F.M., Sepulcre, J., Sabuncu, M.R., Lashkari, D., Hollinshead, M., Roffman, J.L., Smoller, J.W., Zöllei, L., Polimeni, J.R., Fisch, B., Liu, H., Buckner, R.L., 2011. The organization of the human cerebral cortex estimated by intrinsic functional connectivity. *J. Neurophysiol.* 106, 1125–1165.
- Torrecilla, M., Quillinan, N., Williams, J.T., Wickman, K., 2008. Pre- and postsynaptic regulation of locus coeruleus neurons after chronic morphine treatment : a study of GIRK-knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 28, 618–624.
- Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Carolina, N., 2003. Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 13–25.
- Trapnell, C., Pachter, L., Salzberg, S.L., 2009. TopHat: Discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105–1111.
- Trivedi, M., Shah, J., Hodgson, N., Byun, H., Deth, R., 2014. Morphine Induces Redox-Based Changes in Global DNA Methylation and Retrotransposon Transcription by Inhibition of Excitatory Amino Acid Transporter Type 3 – Mediated Cysteine Uptake s. *Mol. Pharmacol.* 85, 747–757.
- UNODC. (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito). Informe Mundial Sobre las Drogas 2019. [WWW Document]. URL: <https://wdr.unodc.org/wdr2019/en/exsum.html> (accessed 4.22.20)
- Upton, R.N., Semple, T.J., Macintyre, P.E., Foster, D.J.R., 2006. Population pharmacokinetic modelling of subcutaneous morphine in the elderly. *Acute Pain* 8, 109–116.
- Vaillancourt, K., Ernst, C., Mash, D., Turecki, G., 2017. DNA Methylation Dynamics and Cocaine in the Brain : Progress and Prospects. *Genes (Basel)*. 8, E138.
- van Alfen-van der Velden, AA; Hopman, J., Klaessens, J., Feuth, T., Sengers, R., Liem, K., 2006. Effects of Midazolam and Morphine on Cerebral Oxygenation and Hemodynamics in Ventilated. *Biol. neonate* 90, 197–202.
- Villalobos, L.B., 2010. Drogadicción, farmacodependencia y drogodependencia: definiciones, confusiones y aclaraciones. *Cuicuilco* 61–81.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Baler, R.D., 2011. Reward, dopamine and the control of food intake: Implications for obesity. *Trends Cogn. Sci* 15, 37–46.
- Volkow, N.D., Baler, R.D., 2014. Addiction science: Uncovering neurobiological complexity. *Neuropharmacology* 76, 235–249.
- Waldhoer, M., Bartlett, S.E., Whistler, J.L., 2004. Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 953–990.
- Walsh, S.L., Preston, K.L., Stitzer, M.L., Cone, E.J., Bigelow, G.E., 1994. Clinical pharmacology of buprenorphine: Ceiling effects at high doses. *Clin. Pharmacol. Ther.* 55, 569–580.
- Wang, D., Zhang, J., Bai, Y., Zheng, X., Alizamini, M.M., Shang, W., Yang, Q., Li, M., Li, Y., Sui, N., 2020. Melanin-concentrating hormone in rat nucleus accumbens or lateral hypothalamus differentially impacts morphine and food seeking behaviors. *J. Psychopharmacol.* [Epub ahead of print].
- Wang, Y.H., Sun, J.F., Tao, Y.M., Chi, Z.Q., Liu, J.G., 2010. The role of K-opioid receptor activation in mediating antinociception and addiction. *Acta Pharmacol. Sin.* 31, 1065–1070.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2 — a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191.
- Weber, J.E., Larkin, G.L., Boe, C.T., Fras, A., Kalaria, A.S., Maio, R.F., Luchessi, B., Ensign, L., Sweeney, B., Hollander, J.E., 2003. Effect of Cocaine Use on Bone Marrow-mediated Erythropoiesis. *Acad. Emerg. Med.* 10, 705–708.

- Wenzel, J.M., Rauscher, N.A., Cheer, J.F., Oleson, E.B., 2014. A Role for Phasic Dopamine Release within the Nucleus Accumbens in Encoding Aversion: A Review of the Neurochemical Literature. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 16–26.
- White, J.M., Irvine, R.J., 1999. Mechanisms of fatal opioid overdose. *Addiction* 94, 961–972.
- WHO (World Health Organization). Lexicon of alcohol and drug terms published by the World Health Organization (version en español). 1994. [WWW Document].  
URL: [https://www.who.int/substance\\_abuse/terminology/who\\_lexicon/en/](https://www.who.int/substance_abuse/terminology/who_lexicon/en/) (accessed 4.22.20)
- Williams, J.T., Ingram, S.L., Henderson, G., Chavkin, C., Zastrow, M. Von, Schulz, S., Koch, T., Evans, C.J., Christie, M.J., 2013. Regulation of  $\mu$ -Opioid Receptors : Desensitization , Phosphorylation , Internalization , and Tolerance. *Pharmacol. Rev.* 65, 223–254.
- Wise, R.A., 1998. Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend.* 51, 13–22.
- Wolf, M.E., 2010. The Bermuda Triangle of cocaine-induced neuroadaptations. *Trends Neurosci.* 33, 391–398.
- Womersley, J.S., Kellaway, L.A., Stein, D.J., Gerhardt, G.A., Russell, V.A., 2016. Effect of cocaine on striatal dopamine clearance in a rat model of developmental stress and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Stress* 19, 78–82.
- World Health Organization. Management of Substance Abuse Team., 2018. Community management of opioid overdose. [WWW Document].  
URL: [https://www.who.int/substance\\_abuse/information-sheet/en/](https://www.who.int/substance_abuse/information-sheet/en/) (accessed 4.21.20).
- World Health Organization, 1994. Glosario de Términos de Alcohol y Drogas [WWW Document].  
URL: [https://www.who.int/substance\\_abuse/terminology/lexicon\\_alcohol\\_drugs\\_spanish.pdf](https://www.who.int/substance_abuse/terminology/lexicon_alcohol_drugs_spanish.pdf) (accessed 4.17.20).
- Wright, K.N., Hollis, F., Duclot, F., Dossat, A.M., Strong, C.E., Francis, T.C., Mercer, R., Feng, J., Dietz, D.M., Lobo, M.K., Nestler, E.J., Kabbaj, M., 2015. Methyl Supplementation Attenuates Cocaine-Seeking Behaviors and Cocaine-Induced c- Fos Activation in a DNA Methylation-Dependent Manner. *J. Neurosci.* 35, 8948–8958.
- Wu, G., Haw, R., 2017. Functional interaction network construction and analysis for disease discovery. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 235–253.
- Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G.W., Vardy, E., Liu, W., Thompson, A.A., Huang, X.P., Carroll, F.I., Mascarella, S.W., Westkaemper, R.B., Mosier, P.D., Roth, B.L., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2012. Structure of the human  $\kappa$ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 485, 327–332.
- Wydra, K., Golembiowska, K., Zaniowska, M., Kamińska, K., Ferraro, L., Fuxe, K., Filip, M., 2013. Accumbal and pallidal dopamine, glutamate and GABA overflow during cocaine self-administration and its extinction in rats. *Addict. Biol.* 18, 307–324.
- Xu, S., Kang, U.G., 2017. Characteristics of ethanol-induced behavioral sensitization in rats: Molecular mediators and cross-sensitization between ethanol and cocaine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 160, 47–54.
- Yadav, V.K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z., Gao, X., Klemenhausen, K.C., Tanaka, K.F., Gingrich, J.A., Edward, X., Tecott, L.H., Mann, J.J., Hen, R., Horvath, T.L., 2009. Leptin regulation of bone mass, appetite and energy expenditure relies on its ability to inhibit serotonin synthesis in the brainstem. *Cell* 138, 976–989.
- Yager, L.M., Garcia, A.F., Wunsch, A.M., Ferguson, S.M., 2015. The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. *Neuroscience* 301, 529–541.
- Yates, A., Akanni, W., Amode, M.R., Barrell, D., Billis, K., Carvalho-Silva, D., Cummins, C., Clapham, P., Fitzgerald, S., Gil, L., Girón, C.G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S.E., Janacek, S.H., Johnson, N., Juettemann, T., Keenan, S., Lavidas, I., Martin, F.J., Maurel, T., McLaren, W., Murphy, D.N., Nag, R., Nuhn, M., Parker, A., Patricio, M., Pignatelli, M., Rahtz, M., Riat, H.S., Sheppard, D., Taylor, K., Thormann, A., Vullo, A., Wilder, S.P., Zadissa, A., Birney, E., Harrow, J., Muffato, M., Perry, E.,

## Bibliografía

- Ruffier, M., Spudich, G., Trevanion, S.J., Cunningham, F., Aken, B.L., Zerbino, D.R., Flicek, P., 2016. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* 44, D710–D716.
- Young, L.J., Wang, Z., 2004. The neurobiology of pair bonding. *Nat. Neurosci.* 7, 1048–1054.
- Zang, L., Shimada, Y., Nishimura, Y., Tanaka, T., Nishimura, N., 2015. Repeated blood collection for blood tests in adult zebrafish. *J. Vis. Exp.* 2015, 1–10.
- Zaniewska, M., Przegali, E., 2015. The Involvement of Norepinephrine in Behaviors Related to Psychostimulant Addiction. *Curr. Neuropharmacol.* 13, 407–418.
- Zhang-james, Y., Lloyd, D.R., James, M.L., Yang, L., Richards, J.B., Faraone, S. V, 2019. Oral Methylphenidate Treatment of an Adolescent ADHD Rat Model Does Not Alter Cocaine-Conditioned Place Preference during Adulthood : A Negative Report. *J. Psychiatry Brain Sci.* 4, e190021.
- Zhang, Z., Pan, Z.Z., 2010. Synaptic Mechanism for Functional Synergism between  $\delta$ - and  $\mu$ -Opioid Receptors. *J. Neurosci* 30, 4735–4745.
- Zheng, M., Lu, J., Zhao, D., 2018. Toxicity and Transcriptome Sequencing (RNA-seq) Analyses of Adult Zebrafish in Response to Exposure Carboxymethyl Cellulose Stabilized Iron Sulfide Nanoparticles. *Sci. Rep.* 8, 1–11.